

**Titre:** Développement d'un procédé pour la culture à haute concentration  
Title: de cellules végétales

**Auteur:** Hélène L'Écuyer-Coelho  
Author:

**Date:** 2000

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** L'Écuyer-Coelho, H. (2000). Développement d'un procédé pour la culture à haute  
Citation: concentration de cellules végétales [Master's thesis, École Polytechnique de  
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8919/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/8919/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de  
recherche:**  
Advisors:

**Programme:** Unspecified  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UN PROCÉDÉ POUR LA CULTURE  
À HAUTE CONCENTRATION DE CELLULES VÉGÉTALES

HÉLÈNE L'ÉCUYER-COELHO  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE CHIMIQUE)

DÉCEMBRE 2000



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**385 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**385, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

**0-612-60902-2**

**Canada**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

DÉVELOPPEMENT D'UN PROCÉDÉ POUR LA CULTURE  
À HAUTE CONCENTRATION DE CELLULES VÉGÉTALES

présenté par : L'ÉCUYER-COELHO, Hélène

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. LEGROS, Robert, Ph. D., président

M. PERRIER, Michel, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. ARCHAMBAULT, Jean, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. GARNIER, Alain, Ph. D., membre

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche M. Michel Perrier et mon codirecteur M. Jean Archambault pour m'avoir acceptée dans leur équipe de recherche et m'avoir permis d'acquérir une formation dans le domaine passionnant des biotechnologies. Merci beaucoup à M. Jean Archambault pour ses nombreux conseils tout au long de ma maîtrise.

Je tiens à remercier mes camarades de travail; Dany Aubry, Laurence Lamboursain, Joël Sirois, Martin Gaudette, Robert Williams, Luc Lavoie, Edith Bouchard-Marchand, Marie-Josée Boudreau, Mario Jolicoeur, Cyril Tikhomiroff et Steve Fiset pour leurs conseils et leur support. Un merci particulier à Dany et Martin, les hommes forts du laboratoire, qui ont démonté de nombreuses fois le couvercle de mon bioréacteur! J'aimerais aussi remercier Laurence qui partage très généreusement ses articles et ses nombreuses théories. Merci beaucoup à Luc pour avoir fourni des analyses de milieu au HPLC deux fois par jour, sept jours semaine.

J'aimerais aussi remercier mon mari, Benoit, pour sa compréhension et ses encouragements. Merci infiniment pour le dépannage informatique! Enfin, merci à mes parents et mes beaux-parents pour les nombreux encouragements.

## RÉSUMÉ

L'objectif principal de ce projet de recherche était d'obtenir des cultures de cellules végétales à haute densité en cuvée alimentée dans le but d'améliorer leur productivité en métabolites secondaires. Les cultures ont été réalisées au moyen d'un bioréacteur à double ruban hélicoïdal d'un volume nominal de 5L. Des cellules d'*Eschscholtzia californica* ont été utilisées comme système modèle pour les cultures.

Dans un premier temps, il était nécessaire d'améliorer le taux de transfert d'oxygène dans le bioréacteur afin de réaliser des cultures à haute densité cellulaire. L'objectif était un coefficient volumique de transfert d'oxygène ( $K_La$ ) de  $10 \text{ h}^{-1}$ , pour une vitesse d'agitation de 60 rpm et un débit gazeux de 0,04 VVM ou moins. Dans ce but, des essais ont été réalisés avec de l'eau dans le bioréacteur. Une première étape consiste à modifier le design du diffuseur pour obtenir des bulles fines.

Par la suite, trois positions pour le diffuseur ont été testées : 1) sur le côté du vaisseau sous les pales de l'agitateur, 2) au centre du vaisseau et 3) décentrée, juste à l'intérieur des pales de l'agitateur. Cette dernière s'est avérée la plus intéressante et a permis d'atteindre un  $K_La$  de  $3,7 \text{ h}^{-1}$  à un débit de 0,02 VVM et une vitesse d'agitation de 60 rpm.

Ce  $K_La$  étant plus faible que notre objectif, plusieurs diffuseurs ont été utilisés simultanément. Deux combinaisons ont été étudiées, soit trois diffuseurs situés sur le

côté et deux diffuseurs situés au centre et en position intermédiaire. La meilleure combinaison était celle des diffuseurs centre et intermédiaire, elle permet d'obtenir un  $K_{La}$  de  $4,6 \text{ h}^{-1}$  pour un débit de  $0,02 \text{ VVM}$  et une vitesse d'agitation de  $60 \text{ rpm}$ . Dans un bioréacteur similaire utilisant un diffuseur placé au centre et pour les mêmes conditions d'opération Sirois (1997) rapporte un  $K_{La}$  de  $3,5 \text{ h}^{-1}$ . Pour un débit de  $0,02 \text{ VVM}$  et une vitesse d'agitation de  $90 \text{ rpm}$ , Sirois rapporte un  $K_{La}$  de  $5,0 \text{ h}^{-1}$  et Aubry (1995) un  $K_{La}$  de  $5,9 \text{ h}^{-1}$  alors que la combinaison du diffuseur central et du diffuseur intermédiaire donne un  $K_{La}$  de  $8,4 \text{ h}^{-1}$ .

Le modèle développé par Sirois (1997) a été utilisé pour élaborer des stratégies d'alimentation afin d'augmenter la concentration cellulaire dans les cultures en cuvette alimentée. Lors des deux premières cultures en bioréacteur, les mêmes points de consigne que ceux utilisés par Sirois au cours de sa meilleure culture ont été employés, soit des concentrations extracellulaires de  $10 \text{ g/L}$  pour les sucres et de  $1 \text{ mM}$  pour le  $\text{NO}_3^-$  et des concentrations intracellulaires de  $0,2 \text{ mM}$  pour le  $\text{NH}_4^+$  et de  $0,05 \text{ mM}$  pour le  $\text{PO}_4^{3-}$ . La culture R4 a permis de constater que les hautes concentrations en biomasse limitaient le transfert d'oxygène. En effet, la biomasse humide était très élevée dans cette culture, elle a atteint une valeur de  $483 \text{ g M.H.}\cdot\text{L}^{-1}$  pour une concentration cellulaire de  $14,5\cdot 10^9 \text{ cellules}\cdot\text{L}^{-1}$ . Pour la culture R5, un ajout de  $20 \text{ g/L}$  de mannitol au milieu de culture a été effectué pour augmenter la pression osmotique et réduire la taille des cellules. Cette approche n'a pas permis d'améliorer le transfert d'oxygène.

Une deuxième stratégie d'alimentation a ensuite été développée. Cette stratégie consistait à préparer les solutions d'ajout dans du milieu B5 complet. De plus, le point de consigne du glucose a été augmenté à 15 g/L et celui du nitrate à 3mM. Cette stratégie de culture n'a toujours pas permis d'améliorer le transfert d'oxygène.

Une troisième stratégie d'alimentation a été expérimentée, elle consistait à maintenir une concentration extracellulaire de 1 mM en ammonium. Cette concentration s'est avérée très difficile à maintenir puisque ce nutriment est absorbé rapidement. Ainsi, lors de la culture R7, la concentration d'ammonium est tombée à zéro ce qui a causé une augmentation de la biomasse humide et donc de la viscosité. Par conséquent, pour la culture R9, le point de consigne pour la concentration extracellulaire d'ammonium a été augmenté à 3 mM et même 5 mM en cours de culture. La concentration en ammonium extracellulaire a pu être maintenue tout au long de la culture. Cette approche a permis de réduire la taille des cellules, la viscosité et donc la limitation du transfert d'oxygène. La dernière culture a atteint une concentration cellulaire de  $20,2 \cdot 10^9$  cellules $\cdot$ L $^{-1}$  à une biomasse humide de 313 g M.H. $\cdot$ L $^{-1}$ . Le maintien d'une concentration d'ammonium dans le milieu semble donc une approche prometteuse puisqu'elle permet d'augmenter la concentration cellulaire tout en limitant la croissance de la biomasse humide. Par conséquent, des concentrations cellulaires élevées peuvent être atteintes sans rencontrer de problèmes de transfert d'oxygène.



## ABSTRACT

The objectives of this project were to culture plant cells at high-density to increase secondary metabolite productivity. This work was performed using a 5-L helical ribbon impeller bioreactor and *Eschscholtzia californica* cells as a biomodel.

During the first phase of this project, the oxygen transfer rate of the bioreactor was increased for high-density cultures at a mixing speed of 60 rpm and an aeration rate of 0,04 VVM or less. The sparger was modified to obtain small gas bubbles. Three sparger locations were tested : 1) on the side of the vessel under the impeller blade, 2) in the centre of the vessel, 3) off-centered inside the impeller blades. The third location yielded the most interesting results with an oxygen transfert coefficient ( $k_{La}$ ) of  $3,7 \text{ h}^{-1}$  at an aeration rate of 0,02 VVM and an impeller speed of 60 rpm. To improve this  $k_{La}$ , numerous spargers were used simultaneously. Two combinations were studied : 1) three spargers on the side of the vessel under the impeller blade, and 2) a central sparger and an off-centered sparger. The latter combination yielded best results with  $k_{La}$  of  $4,6 \text{ h}^{-1}$  at 0,02 VVM and 60 rpm. In a similar bioreactor using a central sparger and for the same operating conditions Sirois (1997) obtained a  $K_{La}$  of  $3,5 \text{ h}^{-1}$ . At an aeration rate of 0,02 VVM and a impeller speed of 90 rpm Sirois obtained a  $K_{La}$  of  $5,0 \text{ h}^{-1}$  and Aubry (1995) a  $K_{La}$  of  $5,9 \text{ h}^{-1}$ . For the same conditions the combination of the central and off-centered spargers yielded a  $K_{La}$  of  $8,4 \text{ h}^{-1}$ .

Sirois's model (1997) was used to develop nutrient feeding strategies to increase cell concentration in fed-batch cultures. During the first two bioreactor cultures, same nutrient set points as those recommended by Sirois were used : 10 g·L<sup>-1</sup> of sugar, 1 mM of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and intracellular concentrations of 0,2 mM of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and 0,05 mM of PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. These cultures showed that oxygen transfer was limited by high biomass concentration. A high wet biomass concentration of 483 g·L<sup>-1</sup> was obtained at a cell concentration of 14,5·10<sup>9</sup> cells·L<sup>-1</sup>. A subsequent culture was performed using 20 g·L<sup>-1</sup> of mannitol to increase osmotic pressure and reduce cell size. Oxygen transfer rate was not improved.

Thereafter, a second feeding strategy was developed which involved preparing feeding solutions in complete B5 medium instead of water. Glucose and nitrate set points were increased to 15 g·L<sup>-1</sup> and 3 mM, respectively. This approach suffered also from oxygen transfer limitations.

A third feeding strategy was experimented which involved maintaining the extracellular ammonium concentration above 1 mM. Since this nutrient is rapidly consumed, this set point could not be maintain easily. During this experiment, this concentration dropped to zero which resulted in an increase in wet biomass concentration and viscosity and a significant reduction in oxygen transfer. Therefore, the set point for extracellular ammonium concentration was increased to 3 mM for the last bioreactor culture. This set point was increased to 5 mM during the culture to prevent extracellular ammonium depletion. A cellular concentration of 20,2·10<sup>9</sup> cells·L<sup>-1</sup> was obtained at a wet biomass

concentration of  $313 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Consequently, maintaining an extracellular ammonium concentration appears to be a valuable approach to increase cell concentration while limiting wet biomass growth and preventing oxygen transfer limitations.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>XX</b>
<b>NOMENCLATURE.....</b>	<b>XXI</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1. PROBLÉMATIQUE.....	4
1.2. OBJECTIFS .....	5
<b>2. REVUE DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>6</b>
2.1. DES MOLÉCULES D'ORIGINE VÉGÉTALE UTILES À L'HOMME.....	6
2.2. LA CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES IN VITRO .....	8
2.2.1. <i>Le taux de croissance</i> .....	8
2.2.2. <i>Le rendement en métabolites secondaires</i> .....	9
2.2.3. <i>La concentration de la biomasse</i> .....	9
2.3. CULTURES DE CELLULES VÉGÉTALES À HAUTE DENSITÉ CELLULAIRE .....	11
2.3.1. <i>La viscosité</i> .....	12
2.3.2. <i>Sensibilité au cisaillement</i> .....	19
2.3.3. <i>Moussage et flottaison des cellules</i> .....	21

2.3.4. Moyens non conventionnels d'augmenter le transfert d'oxygène.....	24
<b>2.4. NUTRITION DES CULTURES DE CELLULES VÉGÉTALES .....</b>	<b>28</b>
2.4.1. Les glucides.....	28
2.4.2. L'azote.....	29
2.4.3. Le phosphate .....	30
2.4.4. Autres nutriments majeurs .....	33
2.4.5. Influence des nutriments sur les cultures de cellules.....	38
2.4.6. Nouvelle approche .....	45
<b>3. OBJECTIFS .....</b>	<b>49</b>
<b>4. MÉTHODOLOGIE .....</b>	<b>50</b>
4.1. LIGNÉE CELLULAIRE ET MAINTIEN .....	50
4.2. LE BIORÉACTEUR À DOUBLE RUBAN HÉLICOÏDAL .... <b>ERREUR! SIGNET NON DÉFINI.</b>	
4.2.1. Description du bioréacteur .....	50
4.2.2. Étude du transfert d'oxygène .....	52
4.2.3. Préparation des cultures en bioréacteur.....	53
4.2.4. Alimentation en oxygène .....	55
4.2.5. Modèle de croissance et planification des ajouts .....	55
4.3. ANALYTIQUE.....	57
4.3.1. Mesures respirométriques .....	57
4.3.2. Analyse du milieu de culture .....	62
4.3.3. Suivi de la croissance des cultures.....	63
4.3.4. Production de sanguinarine.....	65
<b>5. AUGMENTATION DU TRANSFERT D'OXYGÈNE DANS LE BIORÉACTEUR.....</b>	<b>67</b>
5.1. COEFFICIENT DE TRANSFERT D'OXYGÈNE DU BIORÉACTEUR AVANT LES MODIFICATIONS.....	67
5.2. RÉSULTATS DES ÉTUDES EFFECTUÉES SUR LE TRANSFERT D'OXYGÈNE .....	68

5.2.1. Porosité du diffuseur .....	68
5.2.2. Emplacement du diffuseur.....	69
5.2.3. Sens de rotation de l'agitateur.....	71
5.2.4. Combinaison de diffuseurs.....	73
5.3. DISCUSSION.....	74
<b>6. CULTURES À HAUTE DENSITÉ CELLULAIRE EN BIORÉACTEUR .....</b>	<b>77</b>
6.1. CULTURE EN CUVÉE .....	77
6.2. CULTURES À HAUTES DENSITÉS CELLULAIRES.....	81
6.2.1. Cultures en bioréacteur.....	82
6.2.2. Cultures témoins en flacons .....	85
6.3. PREMIÈRE STRATÉGIE DE CULTURE .....	86
6.3.1. Culture R2 : Stratégie d'alimentation de Sirois.....	86
6.3.2. Culture R4 : augmentation de l'inoculum.....	94
6.3.3. Culture R5 : Effet de l'augmentation de l'osmolarité.....	103
6.4. DEUXIÈME STRATÉGIE D'ALIMENTATION .....	111
6.4.1. Profil de croissance.....	112
6.4.2. Principaux nutriments.....	115
6.4.3. Autres macronutriments.....	115
6.4.4. Taux de respiration .....	118
6.4.5. $K_La$ .....	119
6.4.6. Discussion .....	119
6.5. TROISIÈME STRATÉGIE D'ALIMENTATION : CONTRÔLE DE L'AMMONIUM EXTRACELLULAIRE.....	122
6.5.1. Profil de croissance.....	123
6.5.2. Principaux nutriments.....	126
6.5.3. Autres macronutriments .....	127
6.5.4. Taux de respiration .....	132
6.5.5. $K_La$ .....	133
6.5.6. Essais d'élicitation.....	135

6.5.7. Discussion .....	137
6.6. QUATRIÈME STRATÉGIE D'ALIMENTATION : AUGMENTATION DU POINT DE CONSIGNE EN AMMONIUM .....	138
6.6.1. Profil de croissance.....	138
6.6.2. Principaux nutriments.....	141
6.6.3. Autres macronutriments .....	144
6.6.4. Taux de respiration .....	147
6.6.5. $K_{La}$ .....	149
6.6.6. Discussion .....	150
6.7. DISCUSSIONS SYNTHÈSES .....	151
6.7.1. Transfert d'oxygène en culture .....	151
6.7.2. Modèle et cultures .....	153
6.7.3. Effets du maintien d'une concentration extracellulaire d'ammonium.....	155
7. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....	158
7.1. TRANSFERT D'OXYGÈNE .....	158
7.2. CULTURES.....	159
8. RÉFÉRENCES.....	162
ANNEXES.....	171

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 5.1 – COEFFICIENTS DE TRANSFERT D'OXYGÈNE ( $K_{LA}$ EN $H^{-1}$ ) OBTENUS AVEC L'ANCIEN DIFFUSEUR(POROSITÉ 0,2 $\mu$ m, DIAM. 1,25 CM) PLACÉ SUR LE CÔTÉ.....	68
TABLEAU 5.2 - EFFET DE LA POSITION DU DIFFUSEUR SUR LE $K_{LA}$ ( $H^{-1}$ ) À UN DÉBIT D'AIR DE 0,02 VVM POUR DEUX VITESSES D'AGITATION.....	71
TABLEAU 5.3 - EFFET DU SENS DE ROTATION DE L'AGITATEUR SUR LE $K_{LA}$ SELON LA POSITION DU DIFFUSEUR POUR UN DÉBIT D'AIR DE 0,02 VVM ET DEUX VITESSES D'AGITATION .....	72
TABLEAU 5.4 - EFFET DE LA COMBINAISON DE DIFFÉRENTS DIFFUSEURS SUR LE $K_{LA}$ POUR DEUX DÉBITS D'AIR ET DEUX VITESSES D'AGITATION .....	75
TABLEAU 6.1 – RÉSUMÉ DES RÉSULTATS DE CROISSANCE OBTENUS POUR LES PRINCIPALES CULTURES EN BIORÉACTEUR .....	84
TABLEAU 6.2 - RENDEMENT EN SANGUINARINE POUR LA CULTURE 7 .....	136



## LISTE DES FIGURES

FIGURE 4.1 – SCHÉMA DU BIORÉACTEUR .....	51
FIGURE 4.2 – EMLACEMENT DES DIFFUSEURS AINSI QUE DU RUBAN HÉLICOÏDAL .....	53
FIGURE 6.1 – COURBES DE CROISSANCE, ÉVOLUTION DU RAPPORT MASSE HUMIDE/MASSE SÈCHE ET DE LA DENSITÉ CELLULAIRE POUR LA CULTURE F6-4. ....	78
FIGURE 6.2 – COURBES DE CONSOMMATION DES NUTRIMENTS POUR LA CULTURE F6-4. ....	80
FIGURE 6.3 - COURBES DE CROISSANCE, ÉVOLUTION DU RAPPORT MASSE HUMIDE/MASSE SÈCHE ET DE LA DENSITÉ CELLULAIRE POUR LA CULTURE R2. ....	91
FIGURE 6.7 - COURBES DE CONSOMMATION DES PRINCIPAUX NUTRIMENTS POUR LA CULTURE R4. ....	99
FIGURE 6.8 – COURBES DE CONSOMMATION DES MACRONUTRIMENTS SECONDAIRES POUR LA CULTURE R4. ....	100
FIGURE 6.9 – QUOTIENT RESPIRATOIRE, CONCENTRATION EN OXYGÈNE DISSOUS, TAUX DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE, TAUX DE PRODUCTION DE CO <sub>2</sub> ET COEFFICIENT DE TRANSFERT D'OXYGÈNE POUR LA CULTURE R4. ....	101
FIGURE 6.10 - TAUX SPÉCIFIQUES DE CONSOMMATION DE L'OXYGÈNE ET DE PRODUCTION DE CO <sub>2</sub> POUR LA CULTURE R4. ....	102
FIGURE 6.11 - COURBES DE CROISSANCE, ÉVOLUTION DU RAPPORT MASSE HUMIDE/MASSE SÈCHE ET DE LA DENSITÉ CELLULAIRE POUR LA CULTURE R5. ....	107
FIGURE 6.12 - COURBES DE CONSOMMATION DES PRINCIPAUX NUTRIMENTS ET ÉVOLUTION DU PH POUR LA CULTURE R5. ....	108
FIGURE 6.13 - COURBES DE CONSOMMATION DES MACRONUTRIMENTS SECONDAIRES POUR LA CULTURE R5. ....	109
FIGURE 6.14 – QUOTIENT RESPIRATOIRE, CONCENTRATION EN OXYGÈNE DISSOUS, TAUX DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE, TAUX DE PRODUCTION DE CO <sub>2</sub> ET COEFFICIENT DE TRANSFERT D'OXYGÈNE POUR LA CULTURE R5. ....	110
FIGURE 6.15 - TAUX SPÉCIFIQUE DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE ET DE PRODUCTION DE CO <sub>2</sub> POUR LA CULTURE R5. ....	111

FIGURE 6.16 – COURBES DE CROISSANCE, ÉVOLUTION DU RAPPORT MASSE HUMIDE/MASSE SÈCHE ET DE LA DENSITÉ CELLULAIRE POUR LA CULTURE R6. ....	114
FIGURE 6.17 – COURBES DE CONSOMMATION DES PRINCIPAUX NUTRIMENTS POUR LA CULTURE R6. ....	116
FIGURE 6.18 – COURBES DE CONSOMMATION DES MACRONUTRIMENTS SECONDAIRES POUR LA CULTURE R6. ....	117
FIGURE 6.19 – QUOTIENT RESPIRATOIRE, CONCENTRATION EN OXYGÈNE DISSOUS, TAUX DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE, TAUX DE PRODUCTION DE CO <sub>2</sub> ET COEFFICIENT DE TRANSFERT D'OXYGÈNE POUR LA CULTURE R6. ....	121
FIGURE 6.20 – TAUX SPÉCIFIQUE DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE ET DE PRODUCTION DE CO <sub>2</sub> POUR LA CULTURE R6. ....	122
FIGURE 6.21 - COURBES DE CROISSANCE, ÉVOLUTION DU RAPPORT MASSE HUMIDE/MASSE SÈCHE ET DE LA DENSITÉ CELLULAIRE POUR LA CULTURE R7. ....	125
FIGURE 6.22 - COURBES DE CONSOMMATION DES PRINCIPAUX NUTRIMENTS POUR LA CULTURE R7. ....	129
FIGURE 6.23 - COURBES DE CONSOMMATION DES MACRONUTRIMENTS SECONDAIRES POUR LA CULTURE R7. ....	130
FIGURE 6.24 – TAUX DE CONSOMMATION DU MAGNÉSIUM, DES GLUCIDES, DU NITRATE ET DE L'AMMONIUM POUR LA CULTURE R7. ....	131
FIGURE 6.25 – QUOTIENT RESPIRATOIRE, CONCENTRATION EN OXYGÈNE DISSOUS, TAUX DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE, TAUX DE PRODUCTION DE CO <sub>2</sub> ET COEFFICIENT DE TRANSFERT D'OXYGÈNE POUR LA CULTURE R7. ....	134
FIGURE 6.26 - TAUX SPÉCIFIQUE DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE ET DE PRODUCTION DE CO <sub>2</sub> POUR LA CULTURE R7. ....	135
FIGURE 6.27 - COURBES DE CROISSANCE, ÉVOLUTION DU RAPPORT MASSE HUMIDE/MASSE SÈCHE ET DE LA DENSITÉ CELLULAIRE POUR LA CULTURE R9. ....	140
FIGURE 6.28 - COURBES DE CONSOMMATION DES PRINCIPAUX NUTRIMENTS POUR LA CULTURE R9. ....	143

FIGURE 6.29 - COURBES DE CONSOMMATION DES MACRONUTRIMENTS SECONDAIRES POUR LA CULTURE R9. ....	145
FIGURE 6.30 - TAUX DE CONSOMMATION DU MAGNÉSIUM, DES GLUCIDES, DU NITRATE ET DE L'AMMONIUM POUR LA CULTURE R9. ....	146
FIGURE 6.31 – QUOTIENT RESPIRATOIRE, CONCENTRATION EN OXYGÈNE DISSOUS, TAUX DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE, TAUX DE PRODUCTION DE CO <sub>2</sub> ET COEFFICIENT DE TRANSFERT D'OXYGÈNE POUR LA CULTURE R9. ....	148
FIGURE 6.32 - TAUX SPÉCIFIQUE DE CONSOMMATION D'OXYGÈNE ET DE PRODUCTION DE CO <sub>2</sub> POUR LA CULTURE R9 .....	149
FIGURE 6.33 – COMPARAISON DES COURBES DE CROISSANCE EN BIOMASSE SÈCHE MESURÉES ET GÉNÉRÉES PAR LE MODÈLE POUR LES PRINCIPALES CULTURES .....	155

**LISTE DES ANNEXES**

A.1. SOLUTIONS POUR LES COMPTES CELLULAIRES.....	171
A.2. SOLUTIONS D'AJOUT .....	172
A.3. MILIEUX DE CULTURE .....	174
A.4. PRINCIPAUX RÉSULTATS DES CULTURES TÉMOINS EN FLACONS.....	176

## NOMENCLATURE

a	Aire interfaciale gaz-liquide	$\text{m}^2/\text{m}^3$
CHOt	Concentration totale en glucides	$\text{g/L}$
CPR	Taux de production de $\text{CO}_2$	$\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$
CTR	Taux de transfert de $\text{CO}_2$	$\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$
D	Dilution des comptes cellulaires	-
$\text{DCO}_2$	Concentration en $\text{CO}_2$ dissous dans la phase liquide	$\text{mM}$
DO	Concentration en oxygène dissous	$\text{mM}$
$\text{DO}^*$	Concentration en oxygène dissous à saturation avec de l'air	$\text{mM}$
$\text{DO}'$	Concentration en oxygène dissous corrigée	$\text{mM}$
$K_L$	Coefficient de transfert d'oxygène	$\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$
$K_L a$	Coefficient volumique de transfert d'oxygène	$\text{h}^{-1}$
$K_L a_0$	Coefficient volumique de transfert d'oxygène dans l'eau	$\text{h}^{-1}$
$K_L a_g$	Coefficient volumique global de transfert d'oxygène	$\text{h}^{-1}$
$K_L a_s$	Coefficient volumique de transfert d'oxygène à la surface	$\text{h}^{-1}$
M.H.	Masse humide	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
M.S.	Masse sèche	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
n	Comptes cellulaires	cellules
OTR	Taux de transfert d'oxygène	$\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$
OUR	Taux de consommation d'oxygène	$\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$
Q	Débit total des gaz	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$

$qCO_{2c}$	Taux spécifique de production de $CO_2$ pour les cellules	$mM \cdot 10^9 \text{ cellules}^{-1} \cdot h^{-1}$
$qCO_{2m}$	Taux spécifique de production de $CO_2$ pour la biomasse	$mM \cdot g \text{ M.S.}^{-1} \cdot h^{-1}$
$qO_{2c}$	Taux spécifique de consommation de l'oxygène pour les cellules	$mM \cdot 10^9 \text{ cellules}^{-1} \cdot h^{-1}$
$qO_{2m}$	Taux spécifique de consommation de l'oxygène pour la biomasse	$mM \cdot g \text{ M.S.}^{-1} \cdot h^{-1}$
$R_q$	Quotient respiratoire	-
$SCV$	Volume sédimenté des cellules	%
$V$	Volume de la culture	L
$V_c$	Volume de suspension correspondant à un compte cellulaire	$mm^3$
$X$	Concentration en biomasse	g/L
$\tau$	Contrainte de cisaillement	Pa
$\eta$	Viscosité apparente	Pa·s
$\mu_B$	Taux spécifique de croissance de la biomasse sèche	$j^{-1}$
$\mu_C$	Taux spécifique de croissance cellulaire	$j^{-1}$

## 1. INTRODUCTION

L'humanité a, de tout temps, eu recours aux plantes pour se soigner. De nos jours encore, beaucoup de gens utilisent des produits d'origine naturelle pour prendre soin de leur santé. Si certaines des préparations utilisées tiennent plus du folklore que de la médecine, nombre de composés provenant du monde végétal possèdent des propriétés curatives. Dans la médecine occidentale moderne, cent dix-neuf produits provenant des plantes sont utilisés et des vingt-cinq agents pharmaceutiques se vendant le mieux, douze sont des dérivés de produits naturels (Verpoorte, 1998).

Parmi les composés d'intérêt pharmaceutique, les métabolites secondaires végétaux sont particulièrement importants à cause de leurs nombreuses fonctions et de leur activité biologique impressionnante. Les métabolites secondaires sont des composés chimiques complexes non requis pour la croissance et le développement normal des plantes. Cette définition les différencie des composés primaires comme les glucides phosphatés, les acides aminés, les amides, les protéines, les nucléotides, les acides nucléiques, la chlorophylle et les acides organiques qui sont tous essentiels à la vie des plantes. Parmi les métabolites secondaires ayant des propriétés pharmacologiques, les alcaloïdes tiennent une place importante. Ceux-ci sont des molécules complexes qui présentent souvent plusieurs cycles et contiennent toujours de l'azote. De 15 à 20% des plantes en contiendraient une ou plusieurs formes.

Les alcaloïdes sont généralement considérés comme une forme de protection contre les insectes et les herbivores puisque la plupart de ceux-ci sont des poisons. Malgré leur toxicité, nombre d'entre eux ont connu une brillante carrière pharmacologique. Ainsi, Hippocrate (400 av. J.C.) recommandait des extraits de feuilles de saule pour soulager les douleurs de l'accouchement. Il est connu aujourd'hui que les feuilles de saule contiennent des dérivés de l'acide salicylique, un composé proche de l'Aspirine<sup>MC</sup>. De même, au 17<sup>e</sup> siècle, les Européens découvrent que l'écorce des arbres de la famille des Quinquinas (*Cinchona*) en Amérique du Sud peut être utilisée pour traiter la malaria. Le principe actif contenu dans l'écorce est la quinine qui a été isolée en 1823. Celle-ci a été utilisée jusqu'en 1930 dans le traitement de la malaria. La morphine et la codéine sont parmi les alcaloïdes les plus connus. Extraites du pavot (*Papaver somniferum*), elles sont surtout utilisées pour soulager la douleur. D'autres alcaloïdes sont efficaces pour le traitement du cancer. C'est le cas de la vinblastine et de la vincristine extraites de la pervenche de Madagascar (*Catharantus roseus*), qui sont utilisées pour le traitement de différentes formes de leucémie. Le Taxol<sup>TM</sup>, qui provient de l'If (*Taxus*) est, quant à lui, particulièrement efficace dans le traitement du cancer des ovaires et du sein (The Gale Encyclopedia of Science, 1996).

Les Amérindiens aussi connaissaient les vertus de certaines plantes. À l'époque de l'arrivée des premiers colons français, ils mâchaient les racines rouges d'une plante, la Sanguinaire du Canada, pour ses effets anti-inflammatoires sur les gencives. Il se trouve que les racines de cette plante sont riches en sanguinarine, un alcaloïde de type



benzophénantridine. Cet alcaloïde fait partie du système de défense de certaines plantes contre les attaques microbiennes. Or, ce produit présente des propriétés antibiotiques contre les bactéries responsables de la périodontite. Cette maladie des gencives étant très répandue, la sanguinarine constitue donc un outil de choix dans le domaine de l'hygiène dentaire.

Jusqu'à maintenant, la sanguinarine était extraite de plantes de *Macleaya cordata*. L'extraction du produit à partir de la plante est cependant peu appropriée pour la production à grande échelle de ce composé. En effet, elle nécessite la culture de grandes quantités de plantes. De plus, les étapes d'extraction de la sanguinarine à partir de la plante sont extrêmement complexes. Elles font appel à des solvants organiques dangereux et génèrent des déchets toxiques. Par ailleurs, il est impossible de produire la sanguinarine synthétiquement à l'échelle industrielle puisque sa biosynthèse nécessite 17 étapes enzymatiques à partir de la tyrosine, l'acide aminé de départ. Même une synthèse partielle serait complexe puisque le précurseur, la berberine est aussi difficile à obtenir que la sanguinarine elle-même. La production à partir d'organismes recombinants est également impossible puisque le nombre de gènes à cloner serait trop important. La culture de cellules de plantes en suspension semble donc être la seule avenue possible pour la production à grande échelle de cet alcaloïde.

## 1.1. Problématique

La culture de cellules de plantes en suspension pour produire des métabolites secondaires n'est toutefois pas simple. Les métabolites secondaires sont généralement produits en faible quantité par les plantes. Par conséquent, il est difficile de les obtenir en grande quantité par culture cellulaire. Il est donc impératif de trouver les conditions de culture qui permettraient d'augmenter cette production. Pour augmenter la productivité d'une culture, trois moyens sont possibles : 1) augmenter la concentration cellulaire pour la production; 2) réduire le temps de culture en augmentant le taux de croissance; 3) forcer le métabolisme des cellules à produire plus. Une première étape consiste donc à maximiser le taux de croissance et la concentration cellulaire pour la production.

Sirois (1997), a étudié la cinétique de croissance des cellules d'*Eschscholtzia californica*. Ses résultats lui ont permis de développer un modèle pour planifier l'ajout de différents nutriments en cours de culture de façon à prolonger la phase de croissance cellulaire et obtenir une concentration élevée de cellules. Son modèle permet également de prédire la concentration en biomasse obtenue selon les différents ajouts nutritionnels effectués. La concentration cellulaire maximale obtenue par Sirois est de  $20 \times 10^6$  cellules/ml. Cependant, la croissance cellulaire était limitée par le transfert d'oxygène dans le milieu. Une augmentation du transfert d'oxygène du bioréacteur est donc nécessaire pour obtenir des cultures à très hautes densités cellulaires. Dans le cadre de ses travaux, Sirois n'a pas eu l'opportunité de vérifier la reproductibilité de ce résultat. Il est donc

souhaitable d'obtenir des cultures à hautes concentrations cellulaires ( $20 \times 10^9$  cellules/L et plus) de manière reproductible. La culture de cellules d'*Eschscholtzia californica* constitue un modèle intéressant pour l'étude des cultures de cellules végétales à haute densité. En effet, la lignée est stable et pousse très bien in-vitro. De plus, étant donné que plusieurs travaux de recherche ont été effectués sur ces cellules (Aubry, 1995; Sirois, 1997), cette espèce est bien connue par l'équipe de recherche.

## 1.2. Objectifs

L'objectif principal de ce travail de recherche est d'obtenir des cultures à hautes densités cellulaires en cuvée alimentée dans le but d'améliorer la productivité des cultures de cellules végétales pour la production de métabolites secondaires. Dans un premier temps, il est nécessaire d'améliorer le transfert d'oxygène dans le bioréacteur HRI de 5L de façon à pouvoir augmenter la concentration cellulaire. Le second objectif est d'utiliser le modèle développé par Sirois (1997) pour élaborer des stratégies d'alimentation afin d'augmenter la concentration cellulaire dans une culture en cuvée alimentée. Nous ciblons l'obtention de concentrations cellulaires de  $20 \times 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> de manière reproductible.

## **2. REVUE DE LA LITTÉRATURE**

### **2.1. Des molécules d'origine végétale utiles à l'homme**

La découverte de médicaments demande la disponibilité de nombreux composés pouvant être testés pour leur activité biologique. La prospection à large spectre est donc devenue un outil très important dans la recherche de nouveaux médicaments. Cependant, cette technique nécessite un grand nombre de produits à tester pour être efficace. Ceux-ci ne peuvent être fournis uniquement par la synthèse chimique traditionnelle. Deux autres sources sont donc utilisées : la chimie combinatoire et la biodiversité chimique naturelle.

Dans la nature, les espèces coexistent et interagissent les unes avec les autres de plusieurs façons où la chimie joue un rôle important. Ces organismes partagent donc une biochimie similaire nécessaire aux cellules vivantes mais, en plus, produisent une grande variété de métabolites secondaires impliqués dans leurs interactions avec l'environnement. Considérant le nombre d'organismes et le nombre presque infini d'interactions possibles, il n'est pas surprenant qu'une très large variété de métabolismes secondaires ait évolué dans la nature. En 1988, la base de donnée NAPRALERT répertoriait quatre-vingt-huit mille métabolites secondaires. Depuis, environ quatre mille nouveaux métabolites secondaires sont rapportés chaque année. Du nombre d'espèces étudiées et du nombre de composés connus, on peut déduire qu'au moins un million de

composés pourraient être découverts chez toutes les espèces de plantes. La nature offre donc un énorme potentiel pour la découverte de produits bioactifs (Verpoorte, 1998).

Il est évident que les plantes représentent une source pratiquement illimitée de métabolites primaires et secondaires. Les métabolites secondaires végétaux sont d'intérêt majeur à cause de leurs différentes fonctions et de la gamme impressionnante de leurs activités biologiques. Ces produits présentent des propriétés antimicrobiennes, antibiotiques, insecticides, mollusquicides, hormonales et jusqu'à d'importantes activités pharmacologiques (Stöckigt, 1995).

Cependant, l'approvisionnement de ces molécules végétales est souvent limité par plusieurs problèmes presque insurmontables, ce qui cause des difficultés en particulier pour l'évaluation clinique de ces produits. La culture de cellules végétales pourrait être une possibilité pour solutionner ce problème d'approvisionnement. Cette technologie offre une approche alternative intéressante lorsque la plante source est difficile à cultiver, a une longue période de culture, un faible rendement en métabolite ou lorsque la synthèse chimique n'a pas été réussie ou présente des problèmes techniques (Kieran, 1997). Dans le cas des métabolites secondaires, ces difficultés sont toujours rencontrées. En particulier, la synthèse chimique nécessitant plusieurs étapes, le rendement global est trop faible pour permettre la production de quantités suffisantes de métabolites. De plus, en utilisant la culture de cellules végétales, le métabolite peut être produit sous des conditions contrôlées et reproductibles indépendantes des facteurs géographiques et climatiques. Jusqu'à maintenant plus de cent quarante nouveaux produits naturels

provenant des cultures de cellules de plantes sont connus incluant les métabolites obtenus par biotransformation (Stöckigt et al., 1995).

## **2.2. La culture de cellules végétales in vitro**

Les cultures de cellules de plantes sont un moyen intéressant d'obtenir des molécules complexes provenant du monde végétal. Cependant, pour qu'un procédé soit viable, il faut que la productivité soit suffisante ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ ). Cette productivité est fonction de la durée de la culture (temps de croissance et de production), de la concentration en biomasse et du rendement en métabolite, ce dernier étant défini comme la masse de produit obtenue par gramme de biomasse sèche (Scragg, 1995). Pour augmenter la productivité, on peut optimiser trois paramètres : le taux de croissance, le rendement en métabolites secondaires et la concentration cellulaire. Nous discuterons brièvement de chacun de ces paramètres.

### **2.2.1. Le taux de croissance**

Le temps de division des cellules de plantes est de l'ordre de 2 à 3 jours. Par conséquent, la durée de ce genre de culture se situe entre 15 et 30 jours, ce qui est long comparé à d'autres types de culture. Évidemment, augmenter le taux de croissance réduit le temps nécessaire pour effectuer une culture et permet d'augmenter la productivité (Scragg, 1995).

### 2.2.2. Le rendement en métabolites secondaires

Le rendement en métabolites secondaires est le paramètre qui a reçu le plus d'attention dans l'étude des cultures de cellules de plantes et certains hauts rendements ont été obtenus (Scragg, 1995). En particulier Hippolyte et al. rapportent un rendement de 36,0% de la biomasse sèche pour la production d'acide rosmarinique par *Salvia officinalis* (Hippolyte et al. cités par Scragg, 1995). De leur côté, Matsubara et al. (1989) ont réussi à obtenir un rendement en berberine de 7,5% de la biomasse sèche avec des cultures de *Coptis japonica*. Une des méthodes utilisées est la sélection de lignés cellulaires à haut rendement. Une autre option intéressante pour augmenter la production de métabolites qui a été un succès dans plusieurs cas est l'élicitation. En ajoutant des éliciteurs comme des constituants de la paroi cellulaire de certains microorganismes, des enzymes ou des métaux lourds, certaines voies biosynthétiques sont induites. Les composés formés lors de l'élicitation jouent probablement un rôle dans le mécanisme de défense des plantes (Verpoorte et al., 1993). Néanmoins, la plupart des composés d'intérêt commercial sont toujours obtenus à bas rendement malgré de nombreux efforts. Présentement, il n'existe aucune méthode générale pour augmenter le rendement. Il faudra sans doute attendre une meilleure compréhension des voies métaboliques impliquées (Scragg, 1995).

### 2.2.3. La concentration de la biomasse

De ces trois paramètres, le plus facile à optimiser est sans aucun doute la concentration en biomasse. Une augmentation de la concentration en sucres donne généralement une augmentation de la concentration en biomasse. Les concentrations en biomasse en

culture de cellules de plantes sont de 5 à 15 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> en utilisant une concentration en sucre initiale de 10 à 30 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>. Les cellules de plantes ont un contenu en eau de 80 à 90 % ce qui donne une concentration en biomasse sèche théorique maximale de 100 à 200 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>. Cependant, en pratique les plus hautes concentrations en biomasse obtenues se situent plutôt entre 35 et 65 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> (Scragg, 1995).

Jolicoeur et al. (1992) rapportent avoir obtenu de hautes concentrations en biomasse sèche, 25 à 27 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>, correspondant à une concentration en biomasse humide de 450 à 500 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup> pour des cultures en cuvée effectuées dans un bioréacteur de 11L équipé d'un agitateur à double ruban hélicoïdal. Zhong et Yoshida (1995) rapportent des cultures en cuvée d'une concentration de 38,3 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> effectuées en flacons de 500 ml avec un inoculum élevé (50 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup>) et une concentration initiale en sucrose de 60 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>.

Quelques cultures à haute densité effectuées en cuvée alimentée sont rapportées dans la littérature. Des cultures de *Perilla frutescens* réalisées en flacons de 500 ml par Zhong et Yoshida (1995) ont permis d'obtenir une concentration de 27,7 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> en effectuant des ajouts de tous les composants du milieu sauf les hormones, comparativement à 16,6 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> pour les cultures en cuvée. Zhang et Zhong (1997) rapportent une concentration de 35,1 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> lors de cultures en flacons de *Panax notoginseng* en maintenant la concentration de sucrose au-dessus de 20 g $\cdot$ L<sup>-1</sup> à l'aide d'ajouts comparativement à 24,1 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> pour les cultures en cuvée. Matsubara et al. (1989)



rapportent avoir obtenu en bioréacteur une concentration en biomasse de  $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  au moyen de cuvées alimentées effectuées avec un milieu modifié dont la composition avait été ajustée à partir de la quantité de nutriments absorbés par les cellules cultivées à la concentration habituelle en cuvée.

### 2.3. Cultures de cellules végétales à haute densité cellulaire

La culture de cellules à haute concentration en biomasse est très intéressante pour augmenter la productivité des procédés. Cependant, elle pose plusieurs difficultés. Si ce paramètre est facile à augmenter, maintenir des cultures à haute concentration en biomasse n'est pas simple. En effet, les hautes densités en biomasse et la haute viscosité réduisent l'efficacité du transfert de masse dans les bioréacteurs (Kieran et al., 1997).

Le taux de consommation spécifique d'oxygène pour les cellules végétales est de l'ordre de  $0,2 \text{ mmol O}_2\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Ce taux est faible si on le compare à celui des bactéries ( $10\text{--}12 \text{ mmol O}_2\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  pour *E. coli*), des levures ( $8 \text{ mmol O}_2\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  pour *Saccharomyces cerevisiae*) ou des moisissures ( $3 \text{ mmol O}_2\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  pour *Penecillium*) (Shuler et Kargi, 1992). Cependant, même si les besoins en oxygène des cellules de plantes sont relativement modestes, il peut être difficile de fournir suffisamment d'oxygène pour maintenir une concentration en oxygène dissous adéquate dans le milieu de culture. Or, le niveau d'oxygène dissous a un profond effet sur la croissance et la production de métabolites secondaires. Maintenir une haute concentration en oxygène dissous dans une culture à haute concentration en biomasse

nécessite un bon mélange et une augmentation de l'aération, ce qui pose des problèmes de cisaillement, de moussage et d'entraînement des autres gaz (Scragg, 1995).

Les études sur les effets de l'aération sur les cultures de cellules végétales en suspension ont surtout portées sur l'influence du coefficient volumique de transfert d'oxygène ( $K_La$ ). Le  $K_La$  peut être décomposé comme le produit du coefficient de transfert d'oxygène,  $K_L$  ( $m \cdot h^{-1}$ ), et de l'aire interfaciale entre le gaz et le liquide par unité de volume,  $a$  ( $m^2 \cdot m^{-3}$ ). L'aire interfaciale dépend surtout de la configuration du bioréacteur, de l'agitation mécanique et du bullage alors que  $K_L$  dépend plutôt de la convection, de la turbulence et des propriétés de la phase liquide. Ces deux termes sont liés et ne peuvent pas être clairement séparés. Même si les résultats sont spécifiques au système étudié, il a généralement été conclu que, pour chaque système, une valeur limite du  $K_La$  existe en bas de laquelle la croissance de la culture est inhibée. La productivité en biomasse réduite observée à des débits de gaz plus élevés est attribuable soit à l'entraînement du  $CO_2$  ou à des effets dus au cisaillement (Kieran et al., 1997).

### 2.3.1. La viscosité

La viscosité est un des principaux problèmes rencontrés avec les cultures de cellules végétales à haute concentration en biomasse. Les causes en sont l'agrégation, les interactions entre agrégats, les hautes concentrations en biomasse et, dans certains cas, la sécrétion de polysaccharides et de protéines extracellulaires. L'agrégation est commune et largement attribuable au fait que les cellules ne se séparent pas après la division puisque

naturellement, elles poussent sous forme de tissus. La sécrétion de polysaccharides et de protéines extracellulaires, en particulier à la fin d'une culture en cuvée, peut également contribuer à augmenter l'agrégation (Kieran et al., 1997).

L'effet de la concentration en biomasse sur la viscosité a été étudié. Tanaka (1982) a travaillé sur des suspensions de trois espèces différentes (*Cudrania tricuspidata*, *Vinca rosea* et *Agrostemma githago*) à des densités variant de 10 à 18 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>. Cette étude montre que la viscosité de la suspension dépend surtout de la taille, de la densité et de la concentration des agrégats de cellules de la suspension. Des travaux effectués par Zhong et al. (1992) sur des cellules de *Perilla frutescens* montrent que en dessous d'une concentration de 5 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> la viscosité augmente peu, par contre, au-dessus de 12.8 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> la viscosité augmente très rapidement avec la concentration en biomasse sèche. Il semble que la taille des agrégats, variant de 75 à 500  $\mu$ m, n'ait pas d'effet sur les caractéristiques rhéologiques de la suspension. Par contre, en fin de culture, les auteurs notent que la viscosité apparente augmente, même si la biomasse (en poids sec) diminue d'environ 3 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>. Ils attribuent ce phénomène à une augmentation de la taille des cellules. Il est donc clair qu'au dessus d'une certaine concentration en biomasse, la viscosité augmente rapidement.

De nombreuses études concluent que les suspensions de cellules végétales ont un comportement non-newtonien et pseudoplastique. Tanaka (1982) rapporte un tel comportement pour des suspensions cellulaires de trois espèces différentes (*Cudrania*

*tricuspidata*, *Vinca rosea* et *Agrostemma githago*). Une étude, effectuée par Ballica et Ryu (1993), portant sur des cultures de *Datura stramonium* montre que les suspensions ont un comportement pseudoplastique et présentent un seuil de contrainte. De plus, le comportement non-newtonien des cultures est lié au fait que plus le cisaillement est élevé, plus la taille des agrégats de cellules diminue puisqu'ils se brisent, ce qui a pour effet de réduire la viscosité. Les auteurs suggèrent le modèle de Casson pour décrire ce type de comportement rhéologique. Ce modèle est utilisé pour décrire les suspensions où les particules interagissent et forment des groupes sous forme de chaînes. La taille des chaînes, et donc la viscosité apparente de la suspension, sont considérées comme dépendantes du taux de cisaillement. Dans leur étude Zhong et al. (1992) rapportent que la suspension cellulaire présente les caractéristiques d'un fluide de Bingham avec un faible seuil de contrainte.

Jolicoeur et al. (1992) signalent que des suspensions de *Catharantus roseus* à une concentration de 12 à 15 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>, présentent un comportement pseudoplastique. Une augmentation importante de la viscosité apparente et du comportement rhéofluidisant survient à la fin de la phase exponentielle de croissance à une concentration de 350 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup> qui correspond à une masse sèche de 20 à 23 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>. L'accroissement de la viscosité pourrait être expliqué par le fait qu'à la fin de la phase de croissance, les cellules ont généralement tendance à grossir.

Le principal effet de la viscosité est de réduire le coefficient de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ). Su et Humphrey (1989) ont déterminé que, lorsque la viscosité de la suspension

augmente à 10 c.p., le  $K_{La}$  diminue à 56% de la valeur du  $K_{La}$  mesuré dans l'eau, lorsque le système était opéré à 0,5 VVM et 200 rpm avec une double hélice marine. Tanaka (1982) rapporte que le  $K_{La}$  dépend fortement de la viscosité apparente. Au-dessus d'une certaine viscosité apparente critique, variant selon le type de bioréacteur, le  $K_{La}$  chute rapidement. La valeur critique de la viscosité serait de 36 cp dans un bioréacteur agité à l'aide d'une turbine à pales droites, 70 cp dans un bioréacteur muni d'un agitateur conçu pour les cultures de micro-organismes filamenteux, 6,8 cp pour un bioréacteur gazo-siphon et 3,7 cp dans une colonne à bulles. Dans une autre étude portant sur les mêmes quatre bioréacteurs, Tanaka (1981) illustre que lorsqu'on augmente le débit ou la vitesse d'agitation, pour améliorer le  $K_{La}$ , on augmente aussi le stress hydrodynamique imposé aux cellules. La relation entre le  $K_{La}$  et les contraintes imposées varie d'un bioréacteur à l'autre; cependant, le stress hydrodynamique augmente plus rapidement avec le  $K_{La}$  dans les bioréacteurs munis d'agitateurs. L'étude montre également qu'à des concentrations massiques élevées, le mélange de la suspension n'est pas suffisant et les bulles d'air ne sont plus dispersées de façon satisfaisante, ce qui cause la baisse du  $K_{La}$ . Ce phénomène apparaîtrait à partir d'une biomasse de 11 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> dans les bioréacteurs où le mélange est assuré par le débit de gaz, et de 20 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> dans les bioréacteurs munis d'agitateurs.

Dans leur étude effectuée avec *Datura stramonium* dans un bioréacteur gazo-siphon d'un volume utile de 1,2 L, Ballica et Ryu (1993) rapportent que le  $K_{La}$  diminue avec l'augmentation de la concentration en biomasse. En effet, pour un débit de 1 L $\cdot$ min<sup>-1</sup> le

$K_La$  baisse de 70% ( $40 \text{ h}^{-1}$  à  $12 \text{ h}^{-1}$ ) lorsque le PCV (volume cellulaire décanté, « packed cell volume ») augmente de 0,2 L/L à 0,7 L/L. L'effet est moins marqué à faible débit, puisqu'à  $0,2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  les auteurs rapportent que le  $K_La$  diminue de  $20 \text{ h}^{-1}$  à  $9 \text{ h}^{-1}$  quand le PCV passe de 0,2 L/L à 0,7 L/L. Dans ce cas-ci la réduction est de 55%. Cette diminution du  $K_La$  est attribuée à l'augmentation de la viscosité apparente et au mélange insuffisant. Lorsque la viscosité augmente de 10 cp à 100 cp, les auteurs rapportent que le  $K_La$  diminue de  $35 \text{ h}^{-1}$  à  $10 \text{ h}^{-1}$  pour un débit d'alimentation d'air de  $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  alors que pour un débit de  $0,2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ , le  $K_La$  passe d'une valeur d'environ  $20 \text{ h}^{-1}$  à  $6,5 \text{ h}^{-1}$ .

Dans une étude sur *Nicotiana tabacum* effectuée dans un bioréacteur de 3L équipé d'une hélice marine, Ho et al. (1995) ont effectué des cultures en utilisant différentes vitesses d'agitation. Ils signalent une chute du  $K_La$  mesuré dans le bioréacteur après le début de la croissance exponentielle pour se stabiliser pendant la phase de latence. Pour la culture effectuée à une vitesse d'agitation de 100 rpm, le  $K_La$  diminue de 7 à  $5 \text{ h}^{-1}$  tandis que pour celle effectuée à 325 rpm, le  $K_La$  passe de 22 à  $17 \text{ h}^{-1}$ . Les auteurs en déduisent qu'une augmentation de la concentration en biomasse sèche réduit le coefficient de transfert d'oxygène dans la culture.

Plusieurs auteurs rapportent que la viscosité de la suspension affecte l'efficacité du mélange et donc le transfert d'oxygène. Il est important de remarquer que les agitateurs (hélices marines, pales Rushton, turbines) utilisés dans la plupart des travaux portant sur les cultures de cellules végétales à haute densité sont peu appropriés pour le mélange de suspensions non newtoniennes. Il s'agit généralement d'agitateurs développés pour les

cultures bactériennes qui ne présentent pas la même sensibilité au cisaillement que les cultures de cellules végétales et ne posent pas de problème de viscosité. En effet, dans les suspensions de cellules végétales, qui présentent un comportement pseudoplastique, plus le taux de cisaillement est élevé plus la viscosité apparente diminue. Par conséquent, près de l'agitateur, le mélange est efficace mais au fur et à mesure qu'on s'en éloigne, le taux de cisaillement diminue, la viscosité apparente augmente et l'efficacité de mélange décroît. Pour maintenir un mélange efficace, il est donc nécessaire d'augmenter la vitesse d'agitation ce qui crée d'importants problèmes de cisaillement.

Pour contrer ce problème, des bioréacteurs, dont le design permet d'assurer un bon mélange tout en maintenant un taux de cisaillement relativement bas, ont été développés. Lors de travaux sur des cellules de *Coptis japonica* inactivées par l'ajout de 0,1% (p/v) de formaldéhyde, Matsubara et al. (1989) rapportent avoir obtenu des  $K_L a$  entre 40 et 90  $\text{h}^{-1}$  pour des débits de gaz de 0,2 VVM, 0,5 VVM et 1,0 VVM dans un bioréacteur de 2,5 L équipé d'une large pale rectangulaire percée. Il ne constate aucune baisse significative du  $K_L a$  pour des concentrations en biomasse de moins de 60 g M.S. $\cdot$ L $^{-1}$ . Il faut cependant remarquer que les débits de gaz employés sont particulièrement élevés, ce qui peut stresser les cellules. Néanmoins, Matsubara et al. rapportent avoir obtenu des concentrations en biomasse de 55 g M.S. $\cdot$ L $^{-1}$  dans des cultures en cuvée alimentée, en utilisant un milieu modifié pour fournir les principaux nutriments proportionnellement à la quantité absorbée par les cellules.

Jolicoeur et al. (1992), pour leur part, ont développé un bioréacteur avec un agitateur à double ruban hélicoïdal (HRI) généralement utilisé pour le mélange de fluides visqueux. La capacité de pompage plus élevée et plus efficace à bas taux de cisaillement du HRI pour ce type de fluide, comparée aux agitateurs de type Rushton ou hélice marine, assure un mélange suffisant et plus uniforme des suspensions de cellules de plantes sensibles et leur meilleure performance en croissance. En effet, Kamen et al. (1992) ont étudiés l'efficacité de pompage en fonction du taux de cisaillement de plusieurs types d'agitateurs. Leurs résultats montrent clairement que l'agitateur à double ruban hélicoïdal permet d'obtenir une efficacité de pompage au moins quatre fois plus élevée pour un même taux de cisaillement que les autres types d'agitateurs (agitateur à huit pales droites, turbine à huit pales et hélice marine à trois pales).

La viscosité est donc principalement causée par la présence d'agrégats, les hautes concentrations en biomasse et la sécrétion de polysaccharides et de protéines extracellulaires. Les conséquences les plus importantes de la hausse de viscosité sont la limitation du transfert d'oxygène et la diminution de l'efficacité de mélange. Ces problèmes sont particulièrement importants puisque la puissance d'agitation et le débit d'alimentation des gaz peuvent difficilement être augmentés sans causer de stress aux cellules, celles-ci étant sensibles au cisaillement.



### 2.3.2. Sensibilité au cisaillement

Les cellules de plantes sont sensibles au cisaillement à cause de leur paroi cellulaire rigide, de leur large vacuole et de leur grande taille (Scragg , 1995). Le diamètre d'une cellule végétale est de 5 à 10 fois plus élevé que celui des cellules procaryotes (VanDemark et Batzing, 1987). Les cultures de cellules végétales contiennent des agrégats parmi lesquels ceux de plus de 100 cellules peuvent mesurer plusieurs millimètres de diamètre et sédimenter rapidement (Kieran et al., 1997). Pour maintenir homogène une culture à haute densité, un mélange efficace est donc nécessaire.

De nombreux groupes se sont penchés sur la question de savoir à partir de quel taux de cisaillement les cellules de plantes commencent à subir des dommages. Ces études sont généralement de deux types. Dans le premier type, la suspension biologique est exposée aux forces de cisaillement sous des conditions de croissance pour la durée de la culture ou une période importante de celle-ci. L'environnement hydrodynamique est généralement régulé en changeant le taux ou la méthode d'agitation et/ou d'aération. À cause des difficultés à quantifier le niveau de cisaillement auquel un organisme est exposé dans l'environnement turbulent d'un bioréacteur agité, l'intensité de l'environnement est généralement relié à la vitesse de l'agitateur ou à la puissance fournie (Kieran et al., 1997).

Dans une étude de ce genre portant sur des cellules de *Perilla frutescence*, Zhong et al. (1994) ont quantifié les effets du cisaillement sur la croissance cellulaire dans une série de cultures en cuvée en utilisant un bioréacteur de 5 L avec hélice marine. Les résultats

indiquent qu'il y a une plage optimum de taux de cisaillement, c'est-à-dire un taux de cisaillement moyen de 20 à 30  $\text{s}^{-1}$  correspondant à une vitesse en bout de pale de 0,5 à 0,8 m/s. Ces conditions maximisent le taux de croissance spécifique, la concentration en biomasse maximale, la production spécifique et la productivité en anthocyanes. Dans une étude sur des cellules de *Nicotiana tabacum* effectuée dans un bioréacteur de 3L, équipé d'une hélice marine, Ho et al. (1995) rapportent que l'augmentation de la vitesse d'agitation diminue le taux de croissance de la biomasse et la densité en biomasse finale. En particulier, la densité en biomasse maximale totale est passée de 11,8 g M.S. $\cdot$ L $^{-1}$  à 100 rpm à 8,6 g M.S. $\cdot$ L $^{-1}$  à 325 rpm, une réduction de 27%.

Dans le deuxième type d'études, les cellules sont exposées à des conditions bien définies de flux laminaire ou turbulent pour de courtes périodes de temps parce que ces équipements ne sont généralement pas opérés dans des conditions stériles. Par conséquent, les effets sub-lytiques, tels que des baisses dans le rendement en métabolites ou dans la productivité cellulaire, ne peuvent pas être observés. La réponse du système est donc calculée seulement en perte de viabilité (Kieran et al., 1997). Ainsi, dans une étude sur des cellules de *Morinda citrifolia*, Kieran et al. (1995) signalent que les suspensions cellulaires montrent une susceptibilité significative au cisaillement pour des taux variant entre 25 et 350  $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ . Ils suggèrent également l'utilisation de la dissipation moyenne d'énergie pour évaluer le stress auquel sont soumises les cellules puisqu'il existe une relation linéaire entre la constante de mortalité et ce paramètre.

Yang et Wang (1992) ont développé un modèle de l'interaction entre les bulles et les cellules pour décrire les effets des vortex en surface et du bullage sur les cellules. Leurs travaux montrent que l'interaction entre le bullage et l'agitation mécanique semble avoir un rôle beaucoup plus important que ce qui est prédit en additionnant les effets attribuables à chacun des deux. Le taux de mortalité spécifique est linéairement relié à l'aire interfaciale spécifique des bulles et a aussi été corrélié à la moyenne du taux de dissipation de l'énergie à la puissance 0,89.

La sensibilité au cisaillement des cellules pose donc des problèmes lorsqu'il s'agit d'augmenter la vitesse d'agitation ou le débit d'alimentation des gaz. Elle peut limiter la croissance des cellules et même causer une mortalité importante dans la culture. Il est donc particulièrement important pour les cultures de cellules végétales de limiter le stress lié à l'agitation et au bullage. Une autre raison pour limiter le débit d'aération est le moussage du milieu de culture, un phénomène fréquemment rencontré chez les cellules végétales.

### **2.3.3. Moussage et flottaison des cellules**

Le moussage causé par l'aération des cultures peut être particulièrement sévère dans le cas des cellules végétales en suspension. Même s'il y a peu d'études sur le phénomène et que toutes ont été effectuées à l'échelle du laboratoire ou en usine pilote, le moussage est lié au taux d'aération et aux concentrations extracellulaires en protéines et en polysaccharides (Kieran et al., 1997). Les effets adverses du moussage comprennent la

perte de productivité due à l'entraînement des cellules, la diminution du volume utile du bioréacteur et la contamination due aux débordements de mousse. Dans son étude sur *Atropa belladonna*, Wongsamuth rapporte pour un débit de 3 VVM qu'après 30 minutes de moussage, 55% des cellules se retrouvaient dans la mousse; la proportion augmentait à 75 % après 90 minutes (Wongsamuth, Doran, 1994).

Le moussage est principalement dû aux propriétés du milieu sans cellules et a été entre autre corrélé avec le contenu en protéines. Celles-ci s'adsorbent à l'interface gaz-liquide et sont des surfactants naturels qui diminuent la tension de surface à des valeurs de 40 à 50 mN·m<sup>-1</sup> dans plusieurs milieux de culture. Abaisser la tension de surface en dessous de celle de l'eau (72 mN·m<sup>-1</sup>) facilite la formation de mousse. Des concentrations en protéines aussi basses que 1 mg·L<sup>-1</sup> influencent la formation de mousse. Le volume de mousse est très lié au débit d'air. Il est également dépendant du pH puisque la solution a encore plus tendance à mousser lorsque les protéines sont à leur point isoélectrique. Généralement, les effets dus à la présence de cellules augmentent en fin de culture dans les cultures en cuvée (Wongsamuth, Doran, 1994).

L'utilisation d'antimousse peut avoir un effet adverse sur la croissance de la biomasse. Dans des cultures en flacons de 500 ml, l'addition de propylène glycol 1025 et d'antimousse-C n'a eu aucun effet adverse sur la croissance de la biomasse jusqu'à des concentration de 600 ppm. Par contre, le pluronic PE 6100 à n'importe quelle concentration a eu un effet adverse sur la croissance de la biomasse (Wongsamuth, Doran, 1994).

L'addition d'antimousse réduit également le  $K_La$  dans les bioréacteurs. Lors de cultures d'*Atropa belladonna* effectuées dans un bioréacteur muni d'une sonde de détection de la mousse, de l'antimousse-C était ajouté à chaque fois que la mousse atteignait le niveau de la sonde. Wongsamuth et Doran (1994) rapportent d'importantes baisses du  $K_La$ . Dans une deuxième série d'expériences, réalisées dans une colonne à bulles de 2L et un bioréacteur de 1,5 L équipé de pales Rushton et de chicanes, les auteurs ont fait varier le volume de culture. En augmentant le volume de culture, la surface de liquide se rapprochait de la sonde de détection de la mousse, celle-ci étant fixe pour éviter que la mousse déborde. Plus le volume de culture était élevé, plus il fallait ajouter d'antimousse, puisque l'espace libre entre la surface du liquide et la sonde était moins grand. Cependant, plus on ajoutait d'antimousse, plus le  $K_La$  était affecté. Dans le bioréacteur de type colonne à bulles, le  $K_La$  a chuté de 27 à 7,8 h<sup>-1</sup> si le volume utile était augmenté de 1800 à 1920 ml (l'espace entre la surface du liquide et la sonde passait de 3 à 1 cm). Dans le bioréacteur agité mécaniquement, le  $K_La$  a diminué de 8,4 à 5,4 h<sup>-1</sup> alors que le volume utile était accru de 1100 à 1220 ml (l'espace entre la surface du liquide et la sonde passait de 1,5 à 0,5 cm). Pour les deux types de bioréacteurs, il a fallu utiliser 5 fois plus d'antimousse lors de la culture à volume élevé que pour l'autre culture. L'augmentation du volume utile du bioréacteur a diminué la concentration maximale en biomasse qui pouvait être maintenue dans le bioréacteur à cause de la chute du  $K_La$  (Wongsamuth, Doran, 1994).

Pour éviter l'entraînement des cellules et les débordements causés par le moussage, il est nécessaire de limiter le débit d'alimentation en gaz. Les problèmes rencontrés chez les cultures de cellules végétales en suspension (viscosité, sensibilité au cisaillement et problèmes de moussage) rendent donc l'alimentation en oxygène particulièrement difficile.

#### **2.3.4. Moyens non conventionnels d'augmenter le transfert d'oxygène**

Puisque l'agitation et le débit d'alimentation des gaz ne peuvent être augmentés sans poser des problèmes de cisaillement, certains auteurs ont développé des approches non conventionnelles pour améliorer le transfert d'oxygène. Ces approches visent toutes à améliorer le transfert d'oxygène sans modifier le débit d'alimentation d'air ou l'intensité de l'agitation.

Dans leur étude, Su et Humphrey (1989) ont modifié le système d'aération d'un bioréacteur de 1,25 L. Quatre systèmes pour aérer les cultures de cellules de plantes en suspensions ont été testés. Il rapporte que le meilleur système est celui utilisant l'aération à travers la paroi en silicone d'un tube (longueur : 4,88 m, diamètre externe: 0,2 cm, diamètre interne : 0,15 cm) enroulé autour d'un support cylindrique. L'agitateur, une double hélice marine, était placé au centre du support. Cette aération par membrane permet d'obtenir un OTR semblable à celui obtenu par bullage mais sans bulles de gaz. Pour un débit de 0,05 VVM, les  $K_L a$  obtenus sont de  $1,89 \text{ h}^{-1}$  à 100 rpm et  $2,66 \text{ h}^{-1}$  à 300 rpm. Le  $K_L a$  serait moins affecté par la viscosité avec ce type d'aération. Dans ce

système, le  $K_La$  commence à diminuer à une viscosité de 20 c.p., ce qui est expliqué par une résistance élevée dans la couche limite. Les modifications au système d'alimentation des gaz permettent de limiter les contraintes imposées aux cellules par l'éclatement des bulles. Cependant, elles ne permettent aucunement d'améliorer l'efficacité de l'agitation. Par conséquent, les agitateurs étant peu performants, il risque d'y avoir des zones dans le bioréacteur où l'apport d'oxygène aux cellules sera insuffisant. Ce type de système est également très difficile à mettre à l'échelle.

D'autres façons pour améliorer le transfert d'oxygène dans les bioréacteurs ont été explorées. Parmi elles, la pressurisation peut être un moyen d'augmenter le transfert d'oxygène dans une culture. Cette méthode est particulièrement efficace lorsque le mélange ou une aération vigoureuse sont difficiles. Parce que cette méthode elle-même n'introduit pas de forces hydrodynamiques, elle est aussi intéressante pour les cellules sensibles à l'agitation et au bullage. Dans une étude portant sur des bactéries *E. coli* et une espèce d'algue fragile au cisaillement, *O. malhamensis*, Yang et Wang (1992) rapportent une augmentation significative (plus de 250%, à 2,72 bars pression absolue) du transfert d'oxygène réalisée avec des bioréacteurs déjà existants avec peu de modifications puisqu'ils sont déjà conçus pour supporter la pression lors de l'autoclavage. Cette méthode peut également être appliquée avec d'autres méthodes pour améliorer le transfert d'oxygène. La pressurisation a peu d'effet sur le  $K_La$ . Par contre, la concentration en oxygène dissous à l'équilibre ( $DO^*$ ) augmente linéairement avec la pression totale selon la loi de Henry.

Cependant la solubilité du  $\text{CO}_2$  augmente aussi avec la pression, ce qui peut inhiber la croissance cellulaire. Il existe donc probablement une pression optimale à maintenir dans le bioréacteur (Yang, Wang, 1992). L'échantillonnage des cultures dans un bioréacteur sous pression pose aussi des problèmes. En effet, la pressurisation du bioréacteur complique les manipulations. La dépressurisation rapide des cellules lors de l'échantillonnage risque aussi de les faire éclater. De plus, même si aucune étude n'a été effectuée sur le sujet, il semble que maintenir les cultures sous pression soit problématique dans le cas de cellules végétales. La mise sous pression du bioréacteur peut aussi poser des problèmes de sécurité. En effet, si ces bioréacteurs sont bel et bien conçus pour être stérilisés sous pression, ils ne le sont pas pour être opérés dans ces conditions. Enfin, la pression qu'ils peuvent soutenir est limitée à 1 bar (pression jauge).

L'utilisation de produits chimiques pour modifier les propriétés de la suspension a également été envisagée. Les propriétés des composés perfluorés liquides, particulièrement leur solubilité élevée pour les gaz, les rendent intéressants en biotechnologie. Par exemple, la solubilité de l'oxygène à température et pression normale est de  $44,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans le perfluoro-octyl bromure et le Di(perfluorobutyl)éthène, de  $39,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans le perfluorotripropylamine mais, seulement de  $2,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dans l'eau. Ils peuvent donc faciliter le transfert d'oxygène aux cellules en culture. Dans certains systèmes, ils peuvent même stimuler la production de biomasse et de produits cellulaires d'intérêt commercial. La solubilité des gaz dans les composés perfluorés est reliée au volume moléculaire du gaz dissous. Ils permettent



également de réduire les dommages aux cellules causés par l'aération conventionnelle par bullage et agitation. Étant non miscibles et plus denses que les milieux liquides, ils peuvent être séparés par décantation. La facilité avec laquelle ils peuvent être récupérés et donc recyclés dans un système aqueux rend possible leur utilisation (Lowe et al., 1998).

L'ajout d'agents tensioactifs comme le pluronic<sup>MC</sup> F-68 à faible concentration (0,01% p/v) peut également favoriser le transfert d'oxygène en diminuant la tension de surface et permettant un meilleur transfert aux interfaces. L'ajout de composés, tels que des hydrocarbures ou des composés perfluorés, pour améliorer le transfert d'oxygène, peut cependant poser des problèmes de compatibilité chimique et de toxicité. Ils peuvent également compliquer le procédé de séparation du produit et donc en augmenter le coût en plus de complexifier l'opération et le design du bioréacteur (Yang, Wang, 1992). Enfin, ces produits peuvent parfois aggraver le problème de moussage rencontré avec les cellules de plantes.

À cause des propriétés des cultures de cellules végétales, il n'est pas simple d'augmenter le transfert d'oxygène dans ce type de cultures et l'apport d'oxygène est souvent le facteur limitant la concentration cellulaire.

## **2.4. Nutrition des cultures de cellules végétales**

L'apport de nutriments a également un effet important sur la croissance cellulaire. En effet, les cellules modifient leur métabolisme en fonction du milieu qui les entoure. Par conséquent, pour augmenter la concentration cellulaire des cultures, il est important de s'assurer que les cellules sont dans un environnement favorisant la croissance. Les principaux nutriments qui ont été étudiés pour leur influence sur la croissance des cellules sont les sucres, la source d'azote et le phosphate. Néanmoins, de nombreux autres nutriments sont nécessaires au métabolisme des cellules végétales. Nous survolerons brièvement les différentes fonctions de ces nutriments dans les sections suivantes.

### **2.4.1. Les glucides**

Les cellules végétales ont la capacité de s'approvisionner en carbone en absorbant le  $\text{CO}_2$  de l'atmosphère. À partir du  $\text{CO}_2$  atmosphérique, les réactions de la photosynthèse permettent d'obtenir du glucose mais surtout du sucrose et de l'amidon. Cependant, les cellules cultivées en suspension perdent généralement leurs capacités photosynthétiques. Il est donc nécessaire de leur fournir une source d'glucides qui permet, en conditions aérobies, de produire de l'énergie sous forme d'ATP à travers le métabolisme du glucose (glycolyse et cycle de Krebs) et la respiration (chaîne de transport des électrons). Pour chaque molécule de glucose consommée complètement, 36 molécules d'ATP sont obtenues. De plus, au cours de ce processus, des squelettes carbonés intermédiaires sont fournis pour un grand nombre de composés organiques essentiels aux plantes. Il faut

remarquer que si la glycolyse est la principale voie de dégradation du glucose, il existe d'autres voies métaboliques consommant ce nutriment. L'une d'entre elles, la voie oxydative des pentoses phosphates (VOPP), est particulièrement importante pour la synthèse des métabolites secondaires.

### 2.4.2. L'azote

De tous les macronutriments requis par les plantes, l'azote est celui qui est le plus abondamment consommé et avec le phosphate, un de ceux qui limite le plus souvent la croissance dans la nature. L'azote organique est présent presque exclusivement sous forme réduite. L'azote est présent dans les cellules comme composant des acides aminés, des protéines, des nucléotides, des acides nucléiques, de la chlorophylle et des coenzymes. La plupart des espèces végétales peuvent assimiler l'azote sous forme de nitrate, d'ammonium, d'urée et d'acides aminés. En général, les céréales préfèrent un mélange d'ammonium et de nitrate et consomment une proportion plus élevée d'ammonium que de nitrate par rapport à celle présente dans le sol. Dans plusieurs sols, le nitrate est la source la plus abondante d'azote (Crawford et Glass, 1998).

Le nitrate est aussi un signal pour la croissance puisque les plantes répondent au nitrate en altérant leur métabolisme et en induisant les gènes nécessaires à son assimilation. Ces gènes codent pour des transporteurs qui pompent le nitrate du sol et pour les enzymes nitrate réductase et nitrite réductase qui convertissent le nitrate en ammonium dans la cellule. Quand on fournit aux plantes une source illimitée de nitrate, sa

concentration dans les racines et dans les tiges peut atteindre 100 mM, la majorité étant emmagasinée dans la vacuole (Crawford et Glass, 1998). Les plantes ont différents systèmes de transports avec des affinités distinctes pour le nitrate. Les systèmes à haute affinité permettent l'assimilation du nitrate à faible concentration (en dessous de 1mM). Les plantes possèdent aussi des systèmes à faible affinité pour l'absorption du nitrate à haute concentration (au dessus de 1mM). Le système à faible affinité est exprimé de façon constitutive (Crawford, 1995).

### 2.4.3. Le phosphate

Le phosphore n'est requis chez les plantes que sous la forme totalement oxydé d'orthophosphate ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) (Clarkson, Hanson, 1980). Contrairement à l'azote et au soufre, le phosphore n'est jamais réduit et demeure sous la forme phosphate qu'il soit libre ou lié à des molécules organiques par des liens esters. Le phosphate est une partie essentielle de plusieurs glucides phosphatés impliqués dans la photosynthèse, la respiration et d'autres processus métaboliques. Il est aussi un constituant des nucléotides (ADN et ARN) et des phospholipides présents dans les membranes. Il joue aussi un rôle essentiel dans le métabolisme de l'énergie sous la forme d'ATP, d'ADP, d'AMP et de pyrophosphate. Enfin, le phosphate est l'élément clé dans l'expression des gènes, la régulation métabolique et la croissance contrôlées par la phosphorylation des protéines (Blevins, Reinbott, 1998). Malgré son importance, le  $\text{PO}_4^{3-}$  est un des nutriments les moins disponibles dans plusieurs environnements aquatiques et terrestres. Même s'il est très largement distribué dans la croûte terrestre, la majorité du  $\text{PO}_4^{3-}$  est présent sous

forme de minéraux insolubles qui ne sont pas disponibles pour les plantes (Plaxton, 1998).

La concentration intracellulaire en  $\text{PO}_4^{3-}$  est typiquement 1000 fois plus élevée que dans l'environnement indiquant qu'une quantité significative d'énergie est dépensée pour son absorption active. La manifestation la plus rapide et la plus importante d'un manque de phosphate est une baisse dans sa concentration intracellulaire. Des études ont montré que le cytoplasme et la vacuole fonctionnent comme des compartiments distincts. La vacuole contient typiquement de 85 à 95% du phosphate des cellules non limitées en phosphate. Cette réserve non métabolique fonctionne comme un tampon pour atténuer les fluctuations du  $\text{PO}_4^{3-}$  environnemental. Pendant une limitation en phosphate extracellulaire, le  $\text{PO}_4^{3-}$  vacuolaire est transporté vers le cytoplasme de façon contrôlée proportionnelle à la sévérité du stress. Le maintien sélectif du  $\text{PO}_4^{3-}$  cytoplasmique assure une concentration relativement constante dans les compartiments métaboliquement actifs pendant les fluctuations de courte durée de la disponibilité du  $\text{PO}_4^{3-}$  environnemental. Ce processus évite les perturbations du métabolisme causées par les changements de la disponibilité du phosphate et évite à la cellule la dépense d'énergie élevée nécessaire pour induire différentes réponses aux stress en  $\text{PO}_4^{3-}$ . La concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  cytoplasmique commence à diminuer seulement quand tout le  $\text{PO}_4^{3-}$  vacuolaire a été consommé (Plaxton, 1998).

Pendant un stress en  $\text{PO}_4^{3-}$ , les plantes diminuent la perméabilité de la plasmalemma au  $\text{PO}_4^{3-}$  empêchant par conséquent les fuites de phosphate vers l'environnement. Les

plantes augmentent leur efficacité d'absorption du  $\text{PO}_4^{3-}$  quand la demande augmente ou quand l'approvisionnement diminue. Par ailleurs, la biosynthèse de métabolites secondaires aromatiques, incluant les anthocyanes, les flavonoïdes, les alcaloïdes indoliques, semble être une réponse commune des cellules de plantes qui subissent une privation de  $\text{PO}_4^{3-}$ . Parce que les pigments comme les anthocyanes absorbent la lumière ultraviolette, ils pourraient servir à prévenir les dommages causés à l'acide nucléique pendant une pénurie de  $\text{PO}_4^{3-}$  ainsi qu'à limiter les dommages aux chloroplastes qui peuvent se produire pendant la photosynthèse s'il y a un manque de  $\text{PO}_4^{3-}$ . De plus, les séquences initiales des réactions du métabolisme des aromatiques servent à recycler des quantités significatives de  $\text{PO}_4^{3-}$  à partir de plusieurs esters de phosphate (Plaxton, 1998).

Lors d'études effectuées en cultures hydroponiques, Blevins et Reinbott (1998) ont découvert que l'acquisition des ions  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  par des plantules de blé d'hiver dépend du niveau de  $\text{PO}_4^{3-}$  disponible. À basse concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\approx 10 \mu\text{M}$ ), il y a un net efflux de  $\text{Mg}^{2+}$  et de  $\text{Ca}^{2+}$ . Par contre, à haute concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\approx 75 \mu\text{M}$ ), le  $\text{Mg}^{2+}$  et le  $\text{Ca}^{2+}$  sont absorbés. Pour tenter de déterminer si la concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  aurait un effet sur le contenu en  $\text{Mg}^{2+}$  et en  $\text{Ca}^{2+}$  des feuilles, des cultures hydroponiques à long terme (40 jours) de plantules de blé d'hiver ont été effectuées. La concentration de phosphate dans le milieu variait de 50 à 400  $\mu\text{M}$ . Les résultats indiquent que le contenu en  $\text{Mg}^{2+}$  et en  $\text{Ca}^{2+}$  des feuilles augmente avec la concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  du milieu.

Sakano et al. (1995) ont étudié l'influence du phosphate et de la concentration de l'inoculum sur la croissance cellulaire de cellules de *Catharantus roseus*. Il semble que, pour une concentration en phosphate de 1,25 mM, aucune inhibition de la croissance n'apparaissait si la culture était inoculée au dessus de  $2 \cdot 10^5$  cellules/ml. Par contre, si l'inoculum était réduit à  $10^5$  cellules/ml, plus de la moitié des cellules mourraient avant le deuxième jour et la croissance était sévèrement inhibée. Une inhibition similaire apparaît à une concentration de  $4 \cdot 10^5$  cellules/ml lorsque la concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  était égale ou supérieure à 5 mM. Les cellules dont la croissance était inhibée soit par une inoculation trop faible ou par une trop forte concentration en phosphate présentaient des caractéristiques morphologiques communes : la disparition des granules d'amidon du cytoplasme, l'expansion des cellules avec de fréquentes ruptures. L'inhibition à faible concentration cellulaire initiale était complètement supprimée quand le  $\text{PO}_4^{3-}$  du milieu était réduit proportionnellement à la densité cellulaire. L'inhibition de la croissance cellulaire, dépendante de la concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  à basse concentration cellulaire initiale, est expliquée par une absorption excessive du  $\text{PO}_4^{3-}$  due à un manque apparent de contrôle du processus d'absorption.

#### **2.4.4. Autres nutriments majeurs**

En plus des glucides, de l'azote et du phosphate, d'autres ions sont requis par les cellules de plantes en plus ou moins grande quantité pour leur croissance. Ces ions ont soit un rôle très précis ou jouent plusieurs rôles à l'intérieur de la cellule. Dans cette section nous présentons les principales fonctions de ces ions.

#### 2.4.4.1. Le potassium

C'est le cation cellulaire le plus abondant avec des concentrations cytoplasmiques de 100 mM et plus. De hautes concentrations en  $K^+$  seraient nécessaires pour la conformation active de plusieurs enzymes participant au métabolisme et pour neutraliser les acides organiques et les groupements anioniques des macromolécules dans le cytoplasme qui possède peu de cations organiques. Cet élément très abondant contribue largement au potentiel osmotique des cellules et donc à leur turgescence. Il contribue également à l'équilibre ionique. Il active plusieurs enzymes nécessaires pour la photosynthèse, la respiration et la formation d'amidon et de protéines. Il serait également impliqué dans le transport membranaire et la croissance des cellules (Clarkson, Hanson, 1980).

#### 2.4.4.2. Le sulfate

La majorité du soufre présent dans les plantes se retrouve dans les protéines, plus spécifiquement dans deux acides aminés qui composent les protéines la cystéine et la méthionine. Sous sa forme réduite, le soufre peut être considéré comme un substitut de l'oxygène qui augmente la capacité des composés organiques à complexer les métaux, à participer à des réactions d'oxydo-réduction et de transferts de groupements. De plus, le sulfate forme des ponts disulfures qui stabilisent la structure des protéines. Sous sa forme oxydée, le soufre fournit aux molécules organiques un groupement acide stable qui améliore leur solubilité dans l'eau. Les groupements sulfhydryles peuvent être des sites réactifs sur certains enzymes ou coenzymes. D'autres composés essentiels



contenant du soufre sont les vitamines thiamine et biotine ainsi que le coenzyme A, un composé essentiel à la synthèse et à la dégradation des acides gras. Le soufre sous forme réduite se trouve dans les anneaux hétérocycliques de certaines coenzymes et un certain nombre de produits secondaires des plantes (Clarkson, Hanson, 1980).

#### 2.4.4.3. Le magnésium

Le magnésium est essentiel au fonctionnement de plusieurs réactions parce qu'il se combine avec l'ATP, ce qui lui permet de fonctionner. Il active plusieurs enzymes nécessaires à la photosynthèse, la respiration et la formation de l'ADN et de l'ARN. La concentration en  $Mg^{2+}$  des tissus végétaux est variable mais toujours relativement élevée. L'abondance de cet ion suggère qu'il a de multiples rôles. Il existe une longue liste de réactions enzymatiques nécessitant ou étant favorisés par le  $Mg^{2+}$ . Celles-ci sont généralement des réactions impliquant le transfert de phosphate, de nucléotides ou de groupements carboxyles. Il joue également un rôle dans le fonctionnement d'enzymes de type déshydrogénases, mutases et lyases. Le  $Mg^{2+}$  a un rôle structural dans la chlorophylle. Il est aussi nécessaire pour l'intégrité des ribosomes et contribue à la stabilité structurale des acides nucléiques et des membranes (Clarkson, Hanson, 1980).

#### 2.4.4.4. Le calcium

Le calcium est un composant de la paroi cellulaire. Il joue également un rôle comme cofacteur de certains enzymes. Il est impliqué dans la perméabilité de la membrane cellulaire. Il fonctionne comme régulateur de l'activité membranaire et enzymatique. Le

calcium est nécessaire à la formation d'une nouvelle membrane médiane dans la plaque cellulaire qui se forme entre les cellules filles lors de la division cellulaire. Le calcium est essentiel au fonctionnement normal des membranes probablement parce qu'il permet aux phospholipides de s'attacher les uns aux autres ainsi qu'aux protéines de la membrane. Le  $\text{Ca}^{2+}$  libre est maintenu à très basse concentration dans le cytosol, moins de 1  $\mu\text{M}$ , même si dans plusieurs plantes le calcium est aussi abondant que le phosphore, le soufre et le magnésium. La majorité du calcium dans les plantes est localisé dans la vacuole ou lié à des polysaccharides de pectate de la paroi cellulaire. Dans la vacuole, le calcium est souvent précipité sous forme de cristaux insolubles d'oxalate et, chez certaines espèces, de carbonate, de phosphate ou de sulfate. La concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol doit apparemment être maintenue faible pour éviter la formation de sels insolubles de calcium avec l'ATP et avec d'autres phosphates organiques. De plus, des concentrations au dessus de 1  $\mu\text{M}$  inhibent le brassage cytoplasmique. Malgré le fait que quelques enzymes soient activées par le  $\text{Ca}^{2+}$ , il en inhibe plusieurs. Cette inhibition augmente encore la nécessité de maintenir une faible concentration en calcium dans le cytoplasme où plusieurs enzymes sont présentes. La majorité du calcium présent dans le cytoplasme se lie à une petite protéine appelée calmoduline. Cette liaison modifie la structure de la protéine de telle sorte qu'elle peut ensuite activer de nombreuses enzymes. Le  $\text{Ca}^{2+}$  joue donc un rôle dans l'activation des enzymes principalement quand l'ion est lié à la calmoduline ou à une protéine semblable (Clarkson, Hanson, 1980).

#### 2.4.4.5. Le chlore

Une des fonctions du chlore semble être l'oxydation de la molécule d' $\text{H}_2\text{O}$  pendant la photosynthèse. Il est aussi essentiel pour les racines, pour la division cellulaire dans les feuilles et il est un important soluté osmotiquement actif. Le chlore est absorbé sous forme d'ion  $\text{Cl}^-$  et demeure principalement sous cette forme bien que des traces de plus de 130 composés organiques contenant du chlore aient été identifiés chez les plantes. Le chlore est considéré comme un ion inerte qui est facilement transporté et est toléré dans un vaste éventail de concentrations. Une fonction du chlore est d'agir comme contre-ion lors de mouvements rapides de  $\text{K}^+$  contribuant ainsi au maintien de la turgescence (Clarkson, Hanson, 1980).

#### 2.4.4.6. Le sodium

Le sodium est nécessaire aux plantes utilisant la voie  $\text{C}_4$  de la photosynthèse. Dans les sols salins où le potentiel aqueux est faible, des familles de plantes se sont développées, les halophytes, qui accumulent suffisamment de sels de  $\text{Na}^+$  dans leur vacuole pour maintenir la turgescence et la croissance. Le sodium n'est pas un élément essentiel sauf chez les halophytes et les plantes utilisant le métabolisme  $\text{C}_4$ . Il est aussi probablement impliqué dans l'équilibre osmotique et ionique de plusieurs plantes (Clarkson, Hanson, 1980).

### 2.4.5. Influence des nutriments sur les cultures de cellules

L'apport des nutriments lors de cultures en suspension de cellules est d'une grande importance. En effet, selon les concentrations relatives des différents nutriments présents dans le milieu, les cellules réagiront différemment. Les composants du milieu qui affectent généralement le rendement en métabolites secondaires sont la concentration en sucre, la concentration en phosphate, la source d'azote ainsi que les régulateurs de croissance (Nigra et al., 1989). On comprend donc que les nutriments peuvent avoir une influence à la fois sur la croissance et la production de métabolites.

#### 2.4.5.1. Les glucides

Les glucides sont un élément essentiel du milieu de croissance puisqu'ils fournissent l'énergie nécessaire au métabolisme des cellules. Nigra et al. (1989) ont étudié l'effet des quatre sucres glucose, sucrose, fructose et maltose, sur la croissance de cellules de *Solanum eleagnifolium*. Deux concentrations ont été expérimentées 90 mM et 180 mM. Le sucrose à une concentration de 180 mM a produit la biomasse la plus élevée (2,8 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>) alors que la plus basse concentration a été obtenue avec du maltose (0,4 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>). Pour le glucose et le sucrose, la concentration en biomasse augmente quand la concentration est augmentée de 90 mM à 180 mM. Le fructose, quant à lui semble inhiber la croissance à une concentration de 180 mM.

Mori et Sakurai (1994), pour leur part, ont étudié l'effet de huit sucres (le xylose, le D-mannose, le L-rhamnose, le D-arabinose, le D-galactose, le D-glucose, le sucrose et le

fructose) à une concentration de 20 g/L dans du milieu B5 (voir annexe A.3) sur la croissance et la production d'anthocyanes chez des cellules de *Fragaria ananassa*. La concentration en biomasse la plus élevée a été obtenue dans les milieux contenant du glucose (360 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup>), du sucrose (380 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup>) ou du fructose (340 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup>). La concentration en anthocyanes totaux (mg/L) était plus élevée avec le glucose (84 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>), le sucrose (65 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>) et le fructose (69 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>) qu'avec les autres sucres. De plus, il a été observé qu'une haute concentration en sucrose (50 g/L) favorise la croissance en biomasse et la production de métabolites secondaires comme les anthocyanes. L'utilisation de hautes concentrations en sucrose pour produire des anthocyanes était plus efficace dans un milieu à faible concentration en ammonium comme le milieu B5 (2mM). Do et Cormier (1991), dans leur étude sur *Vitis vinifera*, ont également observé qu'une haute concentration en sucrose (45 g/L) favorisait l'accumulation intracellulaire d'anthocyanes même si la croissance des cellules était réduite. Dans une étude sur *Holarrhena antidysenterica*, Panda et al. (1991) ont trouvé que la concentration en sucrose donnant la meilleure production d'alcaloïdes (100 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>) était de 40 g/L.

En résumé, les sucres permettant d'obtenir la meilleure croissance cellulaire seraient le sucrose et le glucose. Pour les cultures en cuvée, la concentration initiale en sucres du milieu a une influence importante sur la croissance en biomasse et la production de métabolites secondaires. Il semble qu'une haute concentration de sucrose (entre 40 et 50 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>) soit favorable à la production de métabolites secondaires même si parfois la

croissance de la biomasse est diminuée. Cependant, dans des cultures en cuvée alimentée, la concentration en sucres pourrait être plus faible. Ainsi pour des cultures de *Panax notoginseng* en cuvée alimentée effectuées en flacons de 500 ml, de hautes concentrations en biomasse (35,1 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>) ont été obtenues en maintenant la concentration de sucrose au-dessus de 20 g $\cdot$ L<sup>-1</sup> (Zhang, Zhong, 1997). Cette façon de faire présente l'avantage de limiter le moussage causé par une concentration trop élevée en sucres.

#### 2.4.5.2. L'azote

L'azote est un autre nutriment qui peut avoir une influence importante sur la croissance des cellules. En particulier, l'effet du ratio d'ammonium et de nitrate alimenté aux cultures sur la croissance en biomasse et la production de métabolites secondaires, a été largement étudié. Dans une étude portant sur des cellules de *Fragaria ananassa* cultivées dans du milieu Lismaier et Skoog (LS), Mori et Sakurai (1994) ont fait varier la concentration totale d'azote (30 mM et 60 mM) et le ratio  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ . Ils trouvent que la production d'anthocyanes est favorisée par une concentration d'azote totale de 30 mM au lieu de 60 mM, ce qui est près de la concentration habituelle du milieu B5 (27 mM). Le ratio optimal  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  était de 2mM :28mM ce qui diffère peu de celui du milieu B5 (2mM :25mM). Lorsque l'ammonium était la seule source d'azote, ces auteurs rapportent une inhibition de la croissance et de la production d'anthocyanes (R.A. Dixon, 1985).

Dans leur étude sur des cellules de *Solanum aleagnifolium*, cultivées dans du milieu MSRT (milieu MS modifié (annexe A.3), 20 ml·L<sup>-1</sup> de complexe de vitamine RT et 4,5 µM d'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique), Nigra et al. (1990) constatent que la concentration relative  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  a un effet marqué sur la croissance et la production de solasodine. L'accumulation de solasodine ( $4,08 \pm 0,25$  mg/g biomasse sèche) était plus élevée quand les deux sources d'azote étaient alimentées à un ratio  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  de 2 :1. Lorsqu'une seule des deux sources est employée, la croissance et la production de solasodine diminuaient. Un ratio  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  de 2 :1 produisait la biomasse la plus élevée ( $6,88 \pm 0,35$  g M.S.·L<sup>-1</sup>). Ce ratio était également celui le plus favorable pour la production de solasodine. Cette dernière était également améliorée par l'utilisation de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  comme source d'ammonium plutôt que du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Panda et al. (1991) rapportent, pour des cultures de cellules d'*Holarrhena antidysenterica* effectuées dans du milieu MS (annexe A.3), que la production d'alcaloïdes est favorisée par une concentration totale en azote de 60 mM et un rapport  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  de 5 :1. La concentration maximale d'alcaloïdes obtenus était de 38 mg/L pour une concentration en biomasse de 11 g M.S./L. Une concentration en  $\text{NO}_3^-$  élevée favorisait la croissance de la biomasse alors qu'une concentration élevée en  $\text{NH}_4^+$  avait un effet positif sur la synthèse des alcaloïdes. Dans des cultures de *Vitis vinifera*, Do et Cormier (1991) observent qu'une faible concentration en nitrate diminue la croissance mais augmente l'accumulation intracellulaire d'anthocyanes. D'autre part, augmenter la concentration en ammonium de 2 à 8-16 mM, augmente la croissance mais diminue

l'accumulation d'anthocyanes. Ils ont également observé qu'une concentration de 24 mM en ammonium inhibe la croissance des cellules de *Vitis vinifera*.

Dans une étude portant sur plusieurs espèces, Sargent et King (1973) ont étudié l'effet de l'ammonium pour une même concentration totale en azote. Ils ont trouvé que toutes les espèces ne réagissent pas de la même façon à la présence d'ammonium. Des cultures de cellules de soya provenant de cotylédons, de tiges et de racines ont été cultivées avec et sans ammonium. Toutes ces cultures ont montré une amélioration de la croissance en biomasse en présence de  $\text{NH}_4^+$ . Le tabac, le trèfle, le blé, ainsi que des cellules des espèces *Ammi* et *Vicia* ont poussé aussi bien en présence qu'en absence de  $\text{NH}_4^+$ . Seules les cellules d'*Haplopappus* ont mieux poussé en absence de  $\text{NH}_4^+$ .

Une étude sur le soya, dans laquelle la concentration en ammonium du milieu B5 était augmentée, a montré qu'un ajout de 0,1 mM donnait seulement une légère amélioration de la croissance en biomasse. En ajoutant de 0,1 mM à 0,4 mM, la croissance en biomasse augmentait rapidement. Pour un supplément de 0,4 mM à 2 mM, elle continuait à augmenter mais moins rapidement. Au dessus de 2 mM, la croissance en biomasse diminuait rapidement. L'étude a également permis de vérifier que si l'ammonium du milieu B5 (2 mM) était alimentée en plusieurs ajouts, soit 0,2 mM pendant 10 jours ou 0,4 mM pendant 5 jours, la croissance en biomasse était pratiquement la même que si tout l'ammonium était fourni au début de la culture (Sargent, King, 1973).



Il semble que les effets de la source et de la concentration totale en azote sur la croissance et la production de métabolites secondaires soient largement dépendants de l'espèce étudiée. Néanmoins, la plupart des cultures de cellules végétales poussent mieux dans un milieu contenant de l'ammonium et du nitrate. D'autre part, si les cellules peuvent pousser dans un milieu contenant seulement du nitrate, l'ammonium peut difficilement être utilisé comme seule source d'azote puisque, à haute concentration, il devient toxique. La toxicité de l'ammonium à trop haute concentration est généralement liée au fait que l'absorption de cet ion par les cellules cause l'acidification du milieu.

#### 2.4.5.3. Le phosphate

Le phosphate est généralement un des ions absorbés le plus rapidement par les cellules. Dans leur étude sur *Holarrhena antidysenteria*, Panda et al. (1991) ont découvert qu'un accroissement de la concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  jusqu'à 2,5 mM a résulté en un accroissement de la croissance en biomasse ( $18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour 2,5 mM de  $\text{PO}_4^{3-}$  comparativement à  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour 0 mM de  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Par contre, la concentration en alcaloïdes baissait à une concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  de plus de 0,25 mM en phosphate qui était la meilleure concentration ( $35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  pour 0,25 mM de  $\text{PO}_4^{3-}$  comparativement à  $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  pour 2,5 mM de  $\text{PO}_4^{3-}$ ). L'effet du  $\text{PO}_4^{3-}$  sur le contenu en alcaloïdes des cellules était encore plus marqué ( $0,38 \text{ g}/100 \text{ g M.S.}$  à 0,25 mM de  $\text{PO}_4^{3-}$  comparativement à  $0,05 \text{ g/g M.S.}$  à 2,5 mM de  $\text{PO}_4^{3-}$ ), ce qui indique une inhibition sévère de la synthèse à haute concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Dans une étude portant sur *Catharantus roseus* cultivée dans du milieu LS , Hoopen et al. (1994) ont trouvé qu'à faible concentration en  $\text{PO}_4^{3-}$  (0,25 mM) la croissance en biomasse est linéaire pendant toute la période de croissance. Les auteurs observent également une production d'importantes réserves d'glucides à cause de la faible concentration interne en phosphate. Avec la quantité standard de  $\text{PO}_4^{3-}$  dans le milieu (1,25 mM), la croissance en biomasse est exponentielle pendant quelques jours suivie par une croissance linéaire. Le facteur limitant la croissance dans le milieu LS semble être le phosphate. Après consommation de la source de carbone extracellulaire, les réserves et la biomasse structurelle étaient consommées. À haute concentration en phosphate (6,25 mM), la croissance exponentielle était maintenue jusqu'à ce que le glucose du milieu soit complètement consommé. Il n'y avait probablement pas de formation de produit comme l'amidon parce qu'il n'y avait pas de limitation du phosphate interne. L'augmentation de la concentration en biomasse a eu un effet négatif sur la production d'ajmalicine.

En général, l'augmentation de la concentration en phosphate favorise la croissance de la biomasse. Cependant, sa présence en trop grande quantité est néfaste à la production de métabolites secondaires. La quantité de phosphate alimentée aux cultures doit donc être soigneusement contrôlée pour en fournir suffisamment pour la croissance mais éviter que les cellules l'accumulent ce qui peut nuire à la phase de production.

#### 2.4.6. Nouvelle approche

Plusieurs travaux effectués au sein de l'équipe de recherche ont conduit à développer une nouvelle approche pour l'obtention de cultures cellulaires à haute densité. Parmi ces travaux, ceux de Pépin (1996) effectué avec des cellules de *Vitis vinifera* a permis constater que lorsque la prolifération cellulaire cesse, la concentration en biomasse sèche et humide des cellules continue à augmenter. Le suivi de la biomasse ne permet donc pas, de caractériser à lui seul la croissance cellulaire. Elle remarque également qu'à l'arrêt de la division cellulaire, il s'opère un changement dans le taux spécifique d'assimilation de l'oxygène. Par conséquent, le taux volumique de consommation de l'oxygène permet de suivre l'évolution de la culture. Elle découvre également qu'un ajout de sel d'ammonium au moment où la prolifération cellulaire s'arrête permet de relancer la division cellulaire.

Aubry (1995), dans ses travaux visant à développer un procédé pour la production de sanguinarine, constate que les cellules d'*Eschscholtzia californica* se comportent comme celles de *Vitis vinifera*. La croissance de la biomasse est affectée par la source d'azote présente dans le milieu. Cependant, pour relancer la croissance, il est nécessaire de faire un ajout de phosphate et d'ammonium. Aubry obtient aussi la productivité d'alcaloïdes benzophénantridines la plus élevée rapportée jusqu'à maintenant soit  $68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  en induisant la phase de production lorsque le taux volumique de consommation d'oxygène plafonne. Il constate également que la production de sanguinarine n'est pas associée à la

croissance. Cependant, elle est fortement influencée par l'état physiologique des cultures à l'élicitation.

En se basant sur ces travaux, Sirois (1997) a étudié l'influence des nutriments sur la croissance de cellules d'*Eschscholtzia californica* en cuvée alimentée. Il arrive à la conclusion que les glucides n'ont qu'à être présents dans le milieu de culture à une concentration plus ou moins élevée pour assurer une croissance cellulaire. Il suggère donc de maintenir une concentration minimale de 10 g/L pour éviter les problèmes de moussage. Pour ce qui est du phosphate, il constate que sa présence dans le milieu a un effet néfaste sur la croissance cellulaire. Cependant, ce nutriment doit être fourni de manière suffisante pour assurer la formation de certains composants cellulaires. Il suggère donc de faire un ajout de phosphate dans l'inoculum de manière à s'assurer que les cellules disposent d'assez de phosphate sans avoir à en ajouter dans le milieu de culture. Les hautes concentrations en nitrate nuisent également à la croissance de la biomasse sèche ainsi qu'à la prolifération cellulaire. Par contre, la concentration en azote extracellulaire doit être supérieure à zéro pour assurer la croissance de la biomasse sèche. Pour ce qui est de la prolifération cellulaire, il semble qu'une concentration en azote dans le milieu ne soit pas nécessaire pour qu'elle continue, pourvu que les cellules disposent d'une réserve d'ammoniaque intracellulaire. L'ammonium est donc absolument nécessaire pour la prolifération cellulaire mais il doit être présent à l'intérieur des cellules, donc disponible pour la croissance, plutôt qu'extracellulairement. Par conséquent, un ajout d'ammonium dans l'inoculum est recommandé pour permettre

d'augmenter la concentration intracellulaire d'ammonium sans pour autant avoir à augmenter sa concentration dans le milieu.

Sirois a également étudié la cinétique de croissance des cellules *d'Eschscholtzia californica*. Ses résultats lui ont permis de développer un modèle pour planifier l'ajout de différents nutriments en cours de culture de façon à prolonger la phase de croissance cellulaire et obtenir une concentration élevée de cellules. Son modèle permet également de prédire la concentration en biomasse obtenue selon les différents ajouts nutritionnels effectués.

A partir de son modèle Sirois a établi les paramètres de culture permettant d'obtenir des cultures à haute densité cellulaire. Ces paramètres sont les concentrations minimales de glucose, ammonium, nitrate et phosphate à maintenir en tout temps dans le bioréacteur. Ces concentrations sont fixées à  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose, 1 mM de nitrate, 0,02 mM d'ammonium intracellulaire et 0.05 mM de phosphate intracellulaire. Les concentrations cellulaires sont estimées par le modèle. La concentration cellulaire maximale obtenue en culture par Sirois est de  $20 \times 10^6$  cellules/ml. Malheureusement, cette haute concentration cellulaire n'a été obtenue qu'une fois. De plus, Sirois constate qu'une limitation du transfert d'oxygène dans le bioréacteur a causé la mort des cellules.

De ces travaux, il ressort clairement que les nutriments alimentés à une culture permettent dans une certaine mesure de modifier l'état physiologique des cellules. Il est donc intéressant de contrôler l'alimentation des différents nutriments pour favoriser la

croissance, obtenir de hautes concentrations cellulaires et donc augmenter la productivité des cultures de cellules de plantes. Cependant, l'augmentation du transfert d'oxygène est absolument essentielle pour obtenir de hautes densités cellulaires.

### 3. OBJECTIFS

L'objectif principal de ce travail de recherche est d'obtenir des cultures à haute densité cellulaire en cuvée alimentée pour améliorer leur productivité en métabolites secondaires. Ce projet de recherche s'inscrit dans la continuité de celui de Sirois. La concentration cellulaire de  $20 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> qu'il a obtenue à l'aide de son modèle de croissance a été choisie comme objectif à atteindre. Cependant, puisque l'augmentation de la concentration cellulaire était limitée par la disponibilité de l'oxygène, le transfert d'oxygène du bioréacteur devra être amélioré. Sirois a estimé que pour maintenir une telle concentration cellulaire un  $K_{La}$  de 10 h<sup>-1</sup> est nécessaire.

Le bioréacteur utilisé a été originalement conçu pour être opéré en aération de surface et le système d'aération par bullage n'a jamais été vraiment optimisé. Une première étape consiste donc à modifier le bioréacteur pour améliorer le transfert d'oxygène. Les modifications apportées au bioréacteur seront d'abord testées par des calculs de  $K_{La}$  dans l'eau. La configuration offrant le meilleur transfert d'oxygène sera ensuite utilisée en culture pour obtenir des cultures à hautes concentrations cellulaires.

Par la suite, le modèle développé par Sirois sera utilisé pour élaborer des stratégies d'alimentation qui seront utilisées pour obtenir de hautes concentrations cellulaires en cuvée alimentée. Les concentrations de quatre nutriments principaux seront suivies et contrôlées lors des cultures soit : les sucres, le nitrate, l'ammonium et le phosphate.

## 4. MÉTHODOLOGIE

### 4.1. Lignée cellulaire et maintien

La lignée cellulaire utilisée dans ce projet, EC6 de l'espèce *Eschscholtzia californica*, a été développée par le Dr. R. Williams du centre de recherche BIOPRO de l'École Polytechnique de Montréal. Cette lignée était maintenue dans un milieu B5 standard (annexe A.3) additionné de  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  d'acide 2-4 dichlorophenoxyacétique, de  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de kinétine et de  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sucrose. Le pH était ajusté à 5,5 avant la stérilisation (20 minutes,  $121^\circ\text{C}$ , 1 bar) avec une solution de KOH 0,1 N. Cette lignée était sous-cultivée, lorsque le SCV (volume sédimenté des cellules) atteignait 70%, en transférant 80 ml de suspension dans un flacon de 500 ml contenant 160 ml de milieu. Les flacons étaient agités à l'aide d'un agitateur orbital opéré à 120 rpm en présence de lumière et à une température de  $25^\circ\text{C}$ .

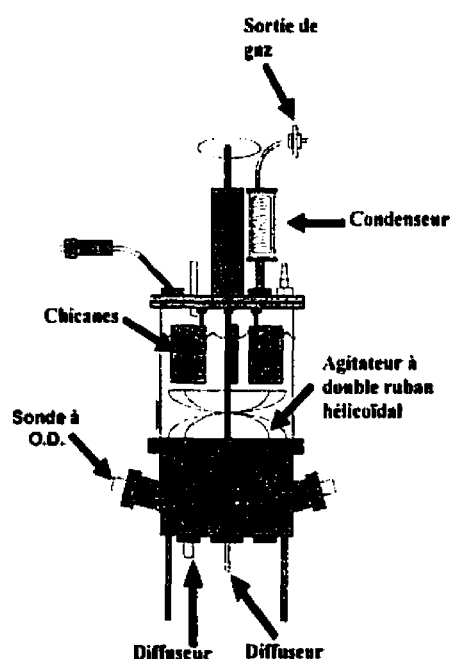
### 4.2. Le bioréacteur à double ruban hélicoïdal

#### 4.2.1. Description du bioréacteur

Un bioréacteur à double ruban hélicoïdal (HRI, Helical Ribbon Impeller) d'un volume nominal de 5L, tel que développé par Jolicoeur et al., a été utilisé ( Figure 4.1). La configuration de la double hélice et des chicanes de surface a été déterminée à partir du bioréacteur original de 11 L (Jolicoeur et al., 1992). Le bioréacteur était équipé d'une sonde polarographique (Ingold) pour mesurer l'oxygène dissous dans le milieu de



culture. La puissance d'agitation était assurée par un moteur de 0,5 hp à vitesse réglable muni d'un tachymètre pour le contrôle de la vitesse d'agitation. L'ensemble des instruments était branché sur un système d'acquisition de données et de contrôle (Bioexpert inc., Québec, Canada).



*Figure 4.1 – Schéma du bioréacteur*  
(© Dany Aubry, 1995)

Ce bioréacteur a été conçu à l'origine pour opérer en aération de surface. Il a été modifié pour permettre une aération par bullage. L'agitateur à double ruban hélicoïdal employé pour les cultures provoque une action de pompage dans le bioréacteur, par conséquent, si l'agitateur est opéré en sens anti-horaire (vu du haut), le fluide descend au centre et monte sur les côtés du réservoir. Si le sens d'agitation est inversé, on observe que le fluide monte au centre et redescend sur les côtés (Jolicoeur et al., 1992). Pour permettre

l'étude de l'influence de ce type d'agitation sur le transfert d'oxygène entre la phase gazeuse et la phase liquide, le bioréacteur a été modifié de manière à installer des diffuseurs au fond du bioréacteur ( Figure 4.2). Le bioréacteur était déjà équipé de trois diffuseurs situés directement sous les pales de l'agitateur (diffuseurs 1, 2 et 3). Un diffuseur a été ajouté au centre du bioréacteur (diffuseur 4), et un autre a été ajouté à l'intérieur des pales (diffuseur 5). Le bioréacteur était équipé de diffuseurs en acier inoxydable d'une porosité de 2  $\mu\text{m}$  et d'un diamètre de 1,25 cm.

#### **4.2.2. Étude du transfert d'oxygène**

Pour mesurer le  $K_{La}$ , le bioréacteur était alimenté en air ou en azote. Les débits alimentés étaient contrôlés à l'aide de débitmètres massiques (Tylan General). Les essais pour les  $K_{La}$  étaient automatisés à l'aide d'un contrôleur pour améliorer la reproductibilité. De plus, afin de minimiser l'effet du volume de la phase gazeuse sur la dynamique du transfert d'oxygène, une purge rapide de la tête du bioréacteur était effectuée avant chaque essai.

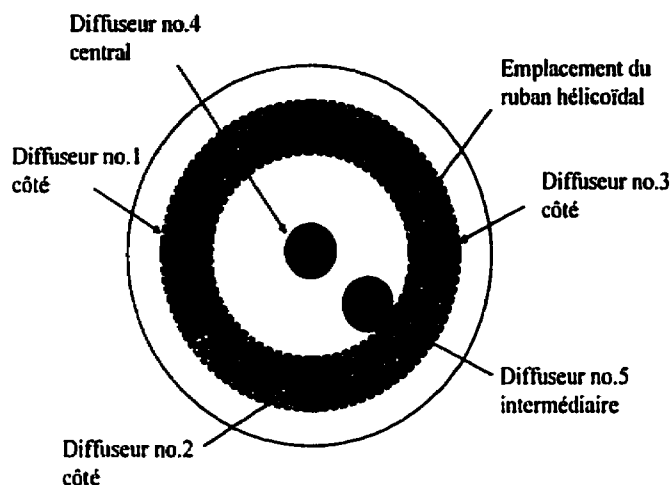


Figure 4.2 – Emplacement des diffuseurs ainsi que du ruban hélicoïdal

#### 4.2.3. Préparation des cultures en bioréacteur

Le bioréacteur était stérilisé pendant 60 minutes à 121°C et 15 psi. Le milieu de culture utilisé était du B5 contenant assez de  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  et glucose pour maintenir les concentrations minimales pendant 24 heures selon le modèle développé par Sirois. La concentration initiale nécessaire pour chacun des nutriments était calculée pour une densité cellulaire à l'inoculation de 4 g M.S. $\cdot$ L $^{-1}$ . La concentration initiale de chacun de ces nutriments a été modifiée au fur et à mesure de l'avancement des travaux selon le point de consigne choisi. Ainsi la concentration initiale en glucose a varié entre 12,3 g.L $^{-1}$  et 16,9 g.L $^{-1}$ , celle en  $\text{NO}_3^-$  entre 2,8 mM et 4,7 mM et celle en  $\text{NH}_4^+$  entre 0,8 mM et 5,4 mM. Pour sa part, la concentration initiale en  $\text{PO}_4^{3-}$  est demeurée constante à 0,21 mM. Le milieu était stérilisé par filtration (Micro Culture Capsule, 0,2  $\mu\text{m}$ , Gelman

science) avant d'être alimenté au bioréacteur. Des flacons témoins de 500 ml étaient préparés pour chaque culture. Deux flacons étaient préparés avec du milieu de culture B5 standard pour vérifier l'état physiologique des cellules. Deux autres flacons étaient préparés avec le même milieu et recevaient les mêmes ajouts que le bioréacteur. Les flacons avec ajouts étaient échantillonnés quotidiennement. Le milieu était stérilisé dans les flacons pendant 30 minutes à 121°C et 15 psi.

Le bioréacteur et les flacons étaient inoculés à une concentration de 2 à 4 g M.S.·L<sup>-1</sup>. Pour éviter que les cultures soient influencées par le milieu provenant des sous-cultures, les cellules étaient filtrées par gravité, rincées et resuspendues avec le même milieu que celui préparé pour le bioréacteur. Ce milieu avait été stérilisé pendant 30 minutes à 121°C à 15 psi.

Pour le suivi de l'oxygène dissous en cours de culture, le bioréacteur était équipé d'une sonde à oxygène dissous de type polarographique (Ingold). La sonde était étalonnée dans le milieu de culture saturé en azote (0%) et en air (100%). Pour le contrôle de la température, le bioréacteur était muni d'une sonde à résistance, collée sur la paroi externe du bioréacteur, et d'une ceinture chauffante; le tout relié à un bloc de contrôle (Viconics). La température tout au long de la culture était maintenue à 26±1°C. Le bioréacteur était également équipé de plusieurs accessoires, incluant un port d'échantillonnage, un port d'inoculation, un port d'alimentation du milieu ainsi qu'un flacon d'inoculation.

#### **4.2.4. Alimentation en oxygène**

Le bioréacteur était équipé d'un système automatique de contrôle de l'alimentation des gaz pour maintenir la concentration en oxygène dissous dans le milieu à 60% de la saturation à l'équilibre avec l'air. Ce système avait pour fonction de mélanger de l'air et de l'oxygène de manière à faire varier la pression partielle d'oxygène dans les gaz alimentés au bioréacteur et ainsi fournir l'oxygène dissous nécessaire à la croissance des cellules végétales. Le contrôle de la pression partielle était réalisé en manipulant le débit d'oxygène alimenté à l'aide d'un débitmètre contrôleur (Tylan General) placé sur le conduit d'oxygène à un débit total des gaz constant (Tylan General). Le débit d'air s'ajustait automatiquement pour combler la différence entre le débit total et le débit d'oxygène. Si la demande en oxygène des cellules augmentait le débit total de gaz pouvait être ajusté manuellement. À l'entrée, les gaz étaient filtrés avec un lit dense de laine de verre alors qu'à la sortie, des filtres stériles de 0,45  $\mu\text{m}$  (Bacterial air vent, Gelman Sciences) étaient utilisés.

#### **4.2.5. Modèle de croissance et planification des ajouts**

Les cultures étaient suivies à l'aide d'un modèle de croissance développé par Sirois (Sirois, 1997). Ce modèle permet de prévoir la concentration en biomasse sèche et de déterminer une stratégie d'alimentation pour le nitrate, l'ammonium, le phosphate et les glucides dans le but de maximiser le taux de croissance de la biomasse. Le modèle considère que les glucides ainsi que l'azote total sont indispensables à la croissance et à la prolifération des cellules en suspension. Par contre, la présence de trop grandes

quantités d'ions phosphate, nitrate et ammonium dans le milieu de culture a un effet nuisible sur la croissance et la prolifération cellulaire. Par conséquent, la concentration de ces ions dans le milieu de croissance doit être étroitement contrôlée pour maximiser la prolifération cellulaire. Dans ses travaux, Sirois suggère de maintenir en tout temps dans le milieu de culture une concentration minimale en sucre de  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  et en nitrate de 3 mM. Pour ce qui est de l'ammonium et du phosphate, il suggère le maintien d'une concentration intracellulaire de 0,2 mM dans le cas de l'ammonium et de 0,05 mM pour le phosphate.

La concentration en biomasse sèche de la culture était fournie quotidiennement au modèle ce qui permettait de développer une stratégie adaptative d'alimentation des nutriments. Les concentrations d'ions dans le milieu étaient également fournies au modèle dès que les données étaient disponibles pour minimiser les erreurs d'évaluation. Le bioréacteur était équipé de réservoirs d'alimentation stériles indépendants pour chacun des quatre nutriments (annexe A.2), ce qui permettait de réajuster la composition du milieu de culture en fonction de la croissance de la biomasse sèche et de maintenir une concentration minimale des ions limitant la prolifération cellulaire (Sirois, 1997).

### 4.3. Analytique

#### 4.3.1. Mesures respirométriques

##### 4.3.1.1. Mesure du taux de consommation d'oxygène et du coefficient de transfert d'oxygène

Le transfert d'oxygène des bulles de gaz jusqu'aux cellules est habituellement limité par le film liquide entourant les bulles. Le taux de transfert (OTR en  $\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de la phase gazeuse à la phase liquide est donc défini par l'équation (4.1) où  $K_L$  est le coefficient de transfert d'oxygène ( $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ ), « a » est l'aire interfaciale ( $\text{m}^2\cdot\text{m}^{-3}$ ),  $K_La$  ( $\text{h}^{-1}$ ) est le coefficient de transfert d'oxygène volumique,  $\text{DO}^*$  (mM) est la concentration d'oxygène dissous à saturation et  $\text{DO}$  (mM) la concentration en oxygène dissous mesurée. Le taux de consommation d'oxygène par les cellules (OUR en  $\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ ) est pour sa part défini par l'équation (4.2) où  $q_{\text{O}_2}$  ( $\text{mM O}_2\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) est le taux spécifique de consommation d'oxygène par la biomasse et  $X$  la concentration en biomasse sèche ( $\text{g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Le taux de variation de la concentration en oxygène dissous dans le milieu en tout temps peut donc être défini comme le taux de transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase liquide moins le taux de consommation d'oxygène par les cellules (équation 4.3).

$$\text{OTR} = K_L a (\text{DO}^* - \text{DO}) \quad (4.1)$$

$$\text{OUR} = q_{\text{O}_2} X \quad (4.2)$$

$$\frac{d(\text{DO})}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR} \quad (4.3)$$

En culture, la concentration en oxygène dissous est contrôlée à 60% de la saturation. Par conséquent, le taux de variation de la concentration en oxygène dissous,  $d(DO)/dt$ , est égal à zéro et l'OTR égale l'OUR. L'équation 4,1 devient donc :

$$OUR = K_L a (DO^* - DO) \quad (4,4)$$

L'estimation de l'OUR a été effectuée à l'aide de la technique développée par Aubry (1996). Cette technique consiste à faire tendre le  $K_L a$  et donc l'OTR vers zéro (équation 4.1). De cette façon l'équation (4.3) se trouve simplifiée de la manière suivante :

$$\frac{d(DO)}{dt} = -OUR \quad (4.5)$$

La chute de la concentration en oxygène dissous ( $d(DO)/dt$ ) mesurée par la sonde donne donc une estimation de l'OUR. Pour ce faire, il faut réduire le plus possible la vitesse d'agitation et couper l'aération de surface et le bullage ce qui fait tendre le  $K_L a$  vers zéro. En pratique, la vitesse d'agitation est réduite de 60 à 30 rpm, ce qui permet de maintenir les cellules en suspension et limite la perturbation sur la lecture de l'oxygène dissous (si le liquide stagne à la surface de la membrane de la sonde polarographique sa dynamique et sa calibration s'en trouvent affectées) tout en réduisant le coefficient de transfert d'oxygène ( $K_L a$ ). Cependant, à une vitesse d'agitation de 30 rpm le transfert d'oxygène à la surface ( $K_{La_s}$ ), bien que faible ( $0,5 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$  mesuré avec 4,75 L d'eau), ne peut pas être considéré comme nul. Il est donc nécessaire de corriger le taux de



consommation de l'oxygène calculé à partir de l'équation (4.4). Pour ce faire, la concentration en oxygène dissous est ajustée à partir d'un modèle de transfert d'oxygène (équation 4.7). Ce modèle corrige la pente de la variation de la concentration en oxygène dissous (DO) mesurée en fonction du temps à l'aide du coefficient de transfert de l'oxygène en aération de surface à 30 rpm, de la mesure de l'oxygène dissous et de la concentration d'oxygène dans la phase liquide à saturation et à l'équilibre avec la phase gazeuse (DO\*). L'équation (4.3) devient donc :

$$\frac{d(DO^*)}{dt} = OUR \quad (4.6)$$

où

$$DO^* = \left( DO(t) - \int_0^t K_L a_v [DO^*(t) - DO(t)] dt \right) \quad (4.7)$$

Le taux de consommation d'oxygène (OUR) était estimé par régression linéaire de la pente de la mesure de la concentration en oxygène dissous, corrigée en fonction du temps. Les équations (4.6) et (4.7) étaient utilisées sous forme discrétisée avec une période d'échantillonnage de 10 secondes. L'arrêt de l'aération était généralement d'une durée de 5 minutes. Cependant, pour éviter d'atteindre une limitation d'oxygène critique pour la viabilité des cellules, ce délai était écourté si la concentration en oxygène dissous atteignait une valeur inférieure à 20%. Après la perturbation, le contrôleur était remis en fonction et la concentration en oxygène dissous revenait au point de consigne.

Cette technique a également permis d'estimer le coefficient de transfert global d'oxygène ( $KLa_g$ ) en faisant quelques hypothèses :

- avant le début de la perturbation  $\frac{d(DO)}{dt} = 0$  (puisque le système est en contrôle);
- le taux de consommation de l'oxygène (OUR) ne change pas pendant la perturbation.

De plus les valeurs de DO et de DO\* étaient mesurées. Le coefficient global de transfert de l'oxygène pouvait donc être estimé à partir de l'équation suivante :

$$KLa_g = \frac{OUR}{(DO^* - DO)} \quad (4.8)$$

#### 4.3.1.2. Mesure du taux de production de CO<sub>2</sub>

La concentration en gaz carbonique dans les gaz de sortie a été analysée grâce à un moniteur à infrarouge (Modèle 870, Rosemount Analytical) d'une capacité 0 à 3,6 %. La calibration linéaire était effectuée à l'aide d'azote 0% et d'un gaz de calibration certifié à 1,21 % en CO<sub>2</sub> (Air-liquide). Pour éviter que la concentration de CO<sub>2</sub> dépasse une concentration de 5% dans les gaz de sortie, ce qui peut nuire à la croissance des cellules, un débit d'air était alimenté en continu dans la tête du bioréacteur. Le débit alimenté était ajusté automatiquement en fonction de la lecture du moniteur à infrarouge.

Connaissant la concentration en  $\text{CO}_2$  du gaz alimenté ( $\text{CO}_{2\text{in}}$ ) au bioréacteur et celle du gaz de sortie ( $\text{CO}_{2\text{out}}$ ), il était possible d'estimer le taux de production de  $\text{CO}_2$  (CPR). La concentration dans le gaz d'alimentation était calculée à partir de la composition du mélange de gaz alimenté à l'entrée du bioréacteur en posant comme hypothèse que l'air contient 0,03 % de  $\text{CO}_2$  et que l'oxygène n'en contient pas. Le taux de production de  $\text{CO}_2$  (CPR) était estimé selon les équations suivantes, en supposant que le transfert du  $\text{CO}_2$  entre la phase liquide et la phase gazeuse est en pseudo-équilibre:

$$\frac{d(\text{DCO}_2)}{dt} \approx 0 \approx \text{CTR} - \text{CPR} \quad (4.9)$$

$$\text{CTR} = \frac{Q \times (\text{CO}_{2\text{out}} - \text{CO}_{2\text{in}})}{V \times 0.0246} \approx \text{CPR} \quad (4.10)$$

où  $\text{DCO}_2$ , est la concentration en  $\text{CO}_2$  dissous dans la phase liquide (mM), CTR, le taux de transfert du  $\text{CO}_2$  ( $\text{mM} \cdot \text{h}^{-1}$ ),  $Q$ , le débit volumique total de gaz ( $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ ),  $\text{CO}_{2\text{out}}$  et  $\text{CO}_{2\text{in}}$  le pourcentage volumique de  $\text{CO}_2$  dans les gaz de sortie et d'entrée respectivement (%), et  $V$  le volume de culture (L). Le facteur 0,0246 correspond au volume (L) d'une mmole de  $\text{CO}_2$  à 1 atm. et  $26^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.1.3. Quotient respiratoire

Le quotient respiratoire (RQ) est une mesure du nombre de moles de  $\text{CO}_2$  produites pour chaque mole d'oxygène consommée. Il permet d'estimer l'utilisation que les cellules

font des glucides. Le quotient respiratoire était déterminé à partir des courbes du OUR et du CPR selon l'équation suivante :

$$RQ = \frac{CPR}{OUR} \quad (4.11)$$

#### 4.3.2. Analyse du milieu de culture

Des échantillons de cellules et de milieu étaient prélevés 2 fois par jour. Le pH du milieu de culture était mesuré (Accumet pHmeter Model 805 MP, Fischer scientifique). Une partie du milieu était ensuite prélevée pour l'analyse des macronutriments résiduels. Ces échantillons de milieu étaient filtrés à 0,45 µm (Millipore, White HAWP, 25mm) et congelés pour leur analyse subséquente.

La concentration du milieu de culture en glucides (sucrose, glucose et fructose) était mesurée au moyen d'un chromatographe en phase liquide de haute performance (HPLC), lequel consistait en une pompe Waters modèle 6000A, un injecteur automatique Gilson modèle 231/401, un détecteur d'indice de réfraction Gilson modèle 132. La séparation était effectuée à l'aide d'une colonne Biorad HPX87C maintenue à 80°C avec de l'eau comme phase mobile (1,0 ml·min<sup>-1</sup>). Les résultats d'analyse étaient intégrés par ordinateur à l'aide du logiciel Gilson 712.

Les ions étaient analysés à l'aide d'un système à chromatographie liquide de haute performance (HPLC) Dionex (Dionex Canada Ltd, Oakville, Canada) équipé d'une pompe à gradient, d'un échantillonneur automatique et d'un détecteur électrochimique en mode conductivité. Le tout était contrôlé par ordinateur grâce au logiciel DIONEX AI-450. Les anions et les cations ont été analysés à une température de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

La séparation des anions était effectuée avec une colonne 4 x 250 mm (IONPAC AS4A-SC, Dionex) munie d'un supprimeur de cations (ASRS-1) en série pour éliminer l'interférence des cations et améliorer le rapport signal sur bruit. La phase mobile était une solution tampon de bicarbonate (1,8 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pour 1,7 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) alimentée à un débit de  $2,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Les cations étaient séparés dans une colonne 4 x 250 mm (IONPAC CS-12, Dionex) avec un supprimeur d'anions (CSRS-1, Dionex) en série pour éliminer l'interférence des anions et améliorer le rapport signal sur bruit. La phase mobile était une solution aqueuse d'acide méthasulphonique (20mM) alimentée à un débit de  $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### **4.3.3. Suivi de la croissance des cultures**

Les cellules étaient séparées du milieu de culture par filtration sous vide (Glass fiber filter, Gelman Science). Cette biomasse était rincée à l'eau distillée puis pesée pour déterminer la concentration en biomasse humide. Elle était ensuite séchée pendant 24

heures à 80°C, puis pesée de nouveau pour déterminer la concentration en biomasse sèche.

Un échantillon de 2 ml de suspension cellulaire était également prélevé pour effectuer un compte cellulaire. Les cellules étaient centrifugées et le surnageant était retiré. Ensuite, elles étaient rincées en ajoutant une solution tampon citrate (annexe A.1) jusqu'à un volume de 4 ml et centrifugées, puis le surnageant était retiré. Cette opération était répétée une deuxième fois, ce qui permettait de rincer la suspension cellulaire et de la préparer pour la réaction enzymatique. La solution enzymatique (annexe A.1) était ajoutée jusqu'à un volume de 4 ml. L'échantillon était ensuite agité à 120 rpm pendant 2 heures, ce qui permettait de dissoudre la paroi pecto-cellulosique des cellules et de dissocier les agrégats cellulaires. La suspension cellulaire était ensuite diluée 10 fois dans la solution tampon citrate pour faciliter le compte cellulaire. La suspension cellulaire diluée était ensuite mélangée en quantité égale avec une solution de fushine (annexe A.1) pour colorer les cellules. Enfin, les cellules étaient comptées sous microscope (Olympus modèle CK2, grossissement final  $\times 100$ ) sur hémacytomètre (Fushs-Rosenthal ultraplane, Hausser Scientific). Deux séries de 4 carreaux sur 16 étaient dénombrées. La concentration cellulaire ( $c$ ) en cellules·ml<sup>-1</sup> est obtenue à l'aide de l'équation suivante :

$$c = \text{moyenne}(n_1, n_2) \times D \times \frac{1}{V_c} \times 1000 \frac{\text{mm}^3}{\text{ml}} \quad (4.12)$$

où  $n_1$  et  $n_2$  représentent les deux comptes cellulaires effectués,  $V_c$  le volume suspension correspondant à chaque compte ( $0,8 \text{ mm}^3$ ) et  $D$  la dilution qui est de 40 selon le présent protocole.

#### **4.3.4. Production de sanguinarine**

Après avoir été récoltées stérilement, les cellules étaient filtrées par gravité et rincées. Les cellules étaient ensuite cultivées dans du milieu B5 sans phosphate contenant  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose (25 g de cellules dans 225 ml de milieu) pour permettre d'éliminer les surplus de phosphate accumulés par les cellules.

La phase de production était induite après 0, 3, 6 et 9 jours de culture dans le milieu B5 sans phosphate. L'élévation était effectuée dans du milieu Murashige et Skoog (annexe A.3) sans phosphate et sans hormone contenant  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose. L'élévateur utilisé était une suspension de chitine ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Pour la production, on cultivait 3 g de cellules dans des flacons de 50 ml contenant 10 ml de milieu MS, 2 ml de suspension de chitine et 2g de résine XAD-7 humide. La résine était utilisée pour adsorber la sanguinarine. La phase de production était d'une durée de 7 jours.

Pour l'extraction, le contenu des flacons était filtré sous vide, rincé puis pesé. Il était ensuite resuspendu dans une solution de méthanol acidifié (méthanol, 0,5% HCl) pour extraire la sanguinarine. La résine et la biomasse étaient ainsi rincées à trois reprises

avec 20 ml, 20 ml, et 10 ml de solution de méthanol acidifiée. Cette solution était ensuite récupérée pour analyse ultérieure.

Pour l'analyse de la quantité de sanguinarine produite, les alcaloïdes étaient d'abord séparés par chromatographie en couche mince à l'aide de plaques de gel de silicate Whatman G K6FD (Chromatographic Specialities, Brockville, Ont. Canada) en utilisant le système D (toluène-MeOH 1:9). Les raies correspondant à la sanguinarine étaient ensuite grattées, diluées dans du méthanol et filtrées (sur laine de verre) pour donner des solutions de sanguinarine pure. La concentration de ces solutions en sanguinarine a ensuite été déterminée par absorption des rayons UV (325 nm). La calibration était effectuée avec quatre dilutions de sanguinarine pure (1, 2, 3 et 5 mg/L) le zéro était, pour sa part, fait avec la solution de méthanol utilisée pour diluer les échantillons de sanguinarine (Williams, Ellis, 1993).



## 5. AUGMENTATION DU TRANSFERT D'OXYGÈNE DANS LE BIORÉACTEUR

D'après les travaux de Sirois, un  $K_La$  de  $10 \text{ h}^{-1}$  dans le bioréacteur était nécessaire pour obtenir une culture de cellules *d'Eschscholtzia californica* à une densité cellulaire de  $20 \cdot 10^9 \text{ cellules} \cdot \text{L}^{-1}$ . Cette valeur doit cependant être obtenue avec un débit d'air relativement faible ( $\leq 0,04 \text{ VVM}$ ) et une vitesse d'agitation réduite (60 rpm) pour éviter d'imposer un taux de cisaillement trop important aux cellules.

### 5.1. Coefficient de transfert d'oxygène du bioréacteur avant les modifications

Le Tableau 5.1 illustre les performances du diffuseur qui était utilisé sur le bioréacteur précédemment. Ce diffuseur était constitué d'une pastille d'acier poreux d'un diamètre de 1,25 cm et d'une porosité de  $0,2 \mu\text{m}$  (Rioux, 1996). Le diffuseur était placé au fond du bioréacteur sur le côté, en dessous des pales de l'agitateur (diffuseur 1, Figure 3.2). La taille des bulles obtenues à l'aide de ce diffuseur était de plusieurs millimètres parce qu'il y avait une fuite importante d'air autour de la pastille. De plus, un important phénomène de coalescence se produisait lorsque les bulles frappaient la pale de l'agitateur. En effet, les bulles se trouvaient alors coincées sous la pale et avaient tendance à s'agglomérer pour former des bulles, qui pouvaient atteindre un diamètre de 1 cm et qui montaient alors très rapidement le long de la pale. Le résultat était que les bulles présentes dans le bioréacteur étaient très grosses et avaient un temps de séjour très

court, ce qui limite le transfert d'oxygène. Le tableau montre que pour atteindre les valeurs de  $K_La$  désirées, il faut utiliser un débit de 0,1 VVM et une vitesse d'agitation de 90 rpm. Or, pour maintenir un taux de cisaillement acceptable, il serait préférable de maintenir la vitesse d'agitation à 60 rpm. D'autre part, pour éviter que le  $\text{CO}_2$  dissous dans le milieu ne soit entraîné, le débit d'air doit être maintenu le plus faible possible, idéalement à moins de 0,04 VVM.

*Tableau 5.1 – Coefficients de transfert d'oxygène ( $K_La$  en  $\text{h}^{-1}$ ) obtenus avec l'ancien diffuseur (porosité  $0,2\mu\text{m}$ , diam. 1,25 cm) placé sur le côté*

0,05 VVM d'air		0,10 VVM d'air	
60 rpm	90 rpm	60 rpm	90 rpm
$3,7 \pm 0,1$	$5,5 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,1$	$11,2 \pm 0,1$

*\*  $K_La$  mesurés dans un volume de 5L d'eau. Trois essais pour chaque mesure. L'erreur est exprimée en écart-type.*

## 5.2. Résultats des études effectuées sur le transfert d'oxygène

### 5.2.1. Porosité du diffuseur

La conception de l'ancien diffuseur ne permettait pas l'obtention de petites bulles. Les bulles obtenues à l'aide de ce diffuseur avait un diamètre variant entre 5 et 10 mm. Par conséquent, un nouveau diffuseur a été fabriqué en utilisant un cylindre plutôt qu'une pastille d'acier poreux. Une porosité de  $2\mu\text{m}$  a été choisie pour éviter que les pores soient bloqués par des protéines lors des cultures. Ceci a permis de diminuer le diamètre

des bulles à environ 1 mm. Pour un même débit, la surface de contact entre la phase gazeuse et la phase liquide se trouve donc augmentée, ce qui devrait permettre d'obtenir de meilleurs  $K_{La}$ . Les résultats pour le nouveau diffuseur situé au même emplacement que l'ancien (diffuseur de côté no.1) sont présentés au Tableau 5.2. Le débit utilisé pour ces mesures de  $K_{La}$  est plus faible que ceux qui ont été utilisés pour les  $K_{La}$  avec l'ancien diffuseur. Ceci dans le but d'obtenir des valeurs de  $K_{La}$  suffisantes, à faible débit, pour limiter le stress hydrodynamique imposé aux cellules. Les valeurs obtenues, ( $0,9 \text{ h}^{-1}$ ) pour un débit de 0,02 VVM et une vitesse d'agitation de 60 rpm, sont loin de celles que nous désirons atteindre. Ceci est en partie attribuable à la coalescence qui se produit lorsque les bulles frappent la pale de l'agitateur. En effet, même si les bulles sont plus fines à la sortie du diffuseur, leur taille augmente rapidement à cause de la coalescence.

### 5.2.2. Emplacement du diffuseur

Afin de minimiser la coalescence, il était nécessaire de changer l'emplacement du diffuseur. Par conséquent, deux nouvelles ouvertures ont été percées dans le fond du bioréacteur, une au centre (diffuseur no.4) juste sous l'arbre de l'agitateur et l'autre décentrée de façon à n'être ni sous l'arbre, ni sous les pales de l'agitateur (diffuseur no.3 intermédiaire). Les mesures de  $K_{La}$  pour les trois positions du diffuseur sont présentées au Tableau 5.2. Il est aisé de constater que la position du diffuseur a une influence importante sur le  $K_{La}$ . La position centrale permet d'obtenir un  $K_{La}$  deux à trois fois plus élevé que lorsque le diffuseur est placé sur le côté. Dans le cas de la position

intermédiaire, les résultats sont encore plus intéressants puisque le  $K_{La}$  est multiplié de trois à quatre fois par rapport à celui obtenu lorsque le diffuseur est placé sur le côté. Ceci est attribué en partie au phénomène de coalescence. En effet, lorsque le diffuseur est placé au centre ou en position intermédiaire les bulles ne frappent plus la pale de l'agitateur. Par conséquent, les bulles demeurent de petites tailles, ce qui favorise le transfert d'oxygène.

Un autre phénomène permet d'expliquer la meilleure performance du diffuseur lorsqu'il est placé au centre ou en position intermédiaire. Il s'agit du profil d'agitation de l'agitateur à double ruban hélicoïdal. En effet, lorsque l'agitateur est utilisé dans le sens anti-horaire (vu du dessus), le liquide est pompé vers le haut le long de la paroi et poussé vers le bas au centre (Jolicoeur et al., 1992). Ce qui implique que lorsque le diffuseur est placé sur le côté, les bulles sont entraînées vers la surface par l'agitateur alors que lorsque le diffuseur est placé au centre ou en position intermédiaire, les bulles se trouvent à être retenues par le liquide qui circule à contre-courant. Ce phénomène était clairement visible dans le bioréacteur. En effet, lorsque le diffuseur était au centre ou en position intermédiaire, un grand nombre de bulles restaient emprisonnées près de l'arbre de l'agitateur formant un nuage de bulles, ce qui n'a jamais été observé lorsque le diffuseur était placé sur le côté.

**Tableau 5.2 - Effet de la position du diffuseur sur le  $K_La$  ( $h^{-1}$ ) à un débit d'air de 0,02 VVM pour deux vitesses d'agitation.**

Diffuseur	60 rpm	90 rpm
Côté (no.1)	$0,9 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$
Centre (no.4)	$3,0 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,1$
Intermédiaire (no. 5)	$3,7 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,1$

*\*  $K_La$  mesurés dans un volume de 5L d'eau. Trois essais pour chaque mesure. L'erreur est exprimée en écart-type.*

### 5.2.3. Sens de rotation de l'agitateur

Il était donc également important de vérifier à quel point le sens de rotation de l'agitateur et, par conséquent, l'hydrodynamique du bioréacteur à double ruban hélicoïdal avaient une influence sur le  $K_La$ . Pour quantifier l'effet du sens de rotation de l'agitateur, des mesures de  $K_La$  ont été effectuées en inversant le sens de rotation de l'agitateur (sens horaire). Les mesures ont été effectuées pour un débit de 0,02 VVM et deux vitesses d'agitation. Le Tableau 5.3 présente les résultats.

Il est facilement observable que, pour le diffuseur no.1 placé sur le côté, le  $K_La$  est nettement amélioré en inversant le sens de rotation (sens horaire). En effet, pour une vitesse d'agitation de 60 rpm, le  $K_La$  est quatre fois plus élevé alors qu'à une vitesse d'agitation de 90 rpm, le  $K_La$  a augmenté de 190%. Cependant, le phénomène de coalescence des bulles demeure important. Par contre, si le diffuseur est placé au centre

(diffuseur no.4), le  $K_{La}$  est meilleur si l'agitateur est utilisé en sens anti-horaire . Le  $K_{La}$  en sens horaire représentant 66% de celui en sens anti-horaire à une vitesse de 60 rpm et 91% à une vitesse de 90 rpm. Pour la position intermédiaire (diffuseur no.5), la tendance est moins claire. Il semble qu'à basse vitesse d'agitation, le sens de rotation de l'agitateur ait peu d'influence sur le  $K_{La}$ . Par contre, à une vitesse de rotation de 90 rpm, le sens anti-horaire permet une légère amélioration du transfert d'oxygène.

À la lumière de ces résultats, la meilleure position pour le diffuseur est la position intermédiaire. Cependant, le  $K_{La}$  visé ne peut être obtenu qu'à un débit de 0,04 VVM et une vitesse d'agitation de 90 rpm (Tableau 5.4). Ces conditions peuvent induire un stress important pour les cellules. Il serait donc préférable d'améliorer encore le transfert d'oxygène pour pouvoir fonctionner à des vitesses d'agitation et des débits gazeux plus faibles.

*Tableau 5.3 - Effet du sens de rotation de l'agitateur sur le  $K_{La}$  selon la position du diffuseur pour un débit d'air de 0,02 VVM et deux vitesses d'agitation*

Diffuseur	Sens anti-horaire		Sens horaire	
	60 rpm	90 rpm	60 rpm	90 rpm
Côté (no.1)	0,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,9 ± 0,2
Centre (no.4)	3,0 ± 0,1	5,4 ± 0,1	2,0 ± 0,3	4,9 ± 0,1
Intermédiaire (no.5)	3,7 ± 0,1	7,1 ± 0,1	3,9 ± 0,1	6,3 ± 0,1

*\*  $K_{La}$  mesurés dans un volume de 5L d'eau. Trois essais pour chaque mesure. L'erreur est exprimée en écart-type.*

#### 5.2.4. Combinaison de diffuseurs

Une autre solution envisagée est d'augmenter la surface des diffuseurs. En effet, augmenter la surface du diffuseur pour un même débit total de gaz permet de diminuer le débit de gaz par unité de surface et donc de limiter la coalescence des bulles à la surface du diffuseur. Les bulles obtenues devraient donc être plus fines. Malheureusement, le fond du bioréacteur n'offrait pas une surface suffisante pour augmenter le diamètre des diffuseurs. Par conséquent, plutôt qu'augmenter la surface des diffuseurs, plusieurs diffuseurs ont été utilisés en parallèle. Le débit total se trouvait donc réparti entre plusieurs diffuseurs, ce qui permettait de diminuer le débit par unité de surface. Deux combinaisons ont été étudiées, soit 3 diffuseurs placés sur le côté (diffuseurs 1, 2 et 3) ou un diffuseur au centre et un diffuseur en position intermédiaire (diffuseurs 4 et 5). Les résultats sont présentés au Tableau 5.4.

La combinaison de plusieurs diffuseurs a permis d'améliorer le transfert d'oxygène. La meilleure combinaison est celle du diffuseur central et du diffuseur intermédiaire. C'est donc celle-ci qui sera retenue pour les cultures. Il est à noter que le  $K_{La}$  visé, soit  $10 \text{ h}^{-1}$ , ne peut pas être obtenu à une vitesse d'agitation de 60 rpm et un débit d'air de 0,02 VVM. Néanmoins, à un débit de 0,04 VVM et une vitesse d'agitation de 60 rpm, nous obtenons un  $K_{La}$  de  $8,0 \text{ h}^{-1}$ , ce qui s'en rapproche.

### 5.3. Discussion

Ces travaux ont permis d'augmenter le  $K_{La}$  d'une valeur de  $3,7 \text{ h}^{-1}$ , à un débit de 0,05 VVM et une vitesse d'agitation de 60 rpm pour l'ancien diffuseur placé sur le côté, à un  $K_{La}$  de  $8,0 \pm 0,2 \text{ h}^{-1}$ , à un débit de 0,04 VVM et une vitesse d'agitation de 60 rpm pour les diffuseurs central et intermédiaire utilisés en parallèle.

Il est intéressant de comparer ces résultats avec ceux obtenus par Sirois (1997) et Aubry (1995) dans un bioréacteur similaire utilisant un diffuseur placé au centre. Sirois rapporte pour un débit de 0,02 VVM, un  $K_{La}$  de  $3,5 \text{ h}^{-1}$  pour une vitesse d'agitation de 60 rpm. Pour le même débit et la même vitesse d'agitation, les diffuseurs central et intermédiaire utilisés en parallèle permettent d'obtenir un  $K_{La}$  de  $4,6 \text{ h}^{-1}$ , une amélioration de 30%. Pour un débit de 0,02 VVM et une vitesse d'agitation de 90 rpm, Sirois rapporte un  $K_{La}$  de  $5,0 \text{ h}^{-1}$  et Aubry un  $K_{La}$  de  $5,9 \text{ h}^{-1}$  alors que la combinaison du diffuseur central et du diffuseur intermédiaire donne un  $K_{La}$  de  $8,4 \text{ h}^{-1}$ . Par conséquent, la nouvelle combinaison de diffuseurs permet d'améliorer le transfert d'oxygène par rapport à ce qui était utilisé dans le passé. Elle devrait donc faciliter le maintien de cultures à hautes concentrations cellulaires.

Pour les cultures en bioréacteur, le volume de la suspension cellulaire sera d'environ 5L, celui ci pouvant varier selon les ajouts de nutriments effectués. La vitesse d'agitation sera maintenue à 60 rpm pour limiter le stress imposé aux cellules. En effet, lors de travaux précédents Aubry (1995) et Sirois (1997) ont montrés que cette vitesse



d'agitation donnait les meilleurs résultats. Le débit d'aération sera maintenu le plus bas possible encore une fois afin de minimiser le stress. Idéalement ce débit devrait être maintenu à moins de 0,04 VVM. Pour augmenter le taux de transfert d'oxygène, tout en limitant le débit d'aération, l'air sera enrichi en oxygène.

*Tableau 5.4 - Effet de la combinaison de différents diffuseurs sur le  $K_{La}$  pour deux débits d'air et deux vitesses d'agitation*

Combinaison de diffuseurs	0,02 VVM		0,04 VVM	
	60 rpm	90 rpm	60 rpm	90 rpm
1 diffuseur de côté (no.1)	$3,6 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,5$
3 diffuseurs de côté (no. 1, 2 et 3)	$3,9 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,1$
Diffuseur intermédiaire (no.5)	$3,7 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,2$	$10,1 \pm 0,3$
Diffuseurs intermédiaire et centre (no. 4 et 5)	$4,6 \pm 0,1$	$8,4 \pm 0,5$	$8,0 \pm 0,2$	$11,9 \pm 0,7$

*\*  $K_{La}$  mesurés dans un volume de 5L d'eau. Sens d'agitation horaire pour les diffuseurs de côté et anti-horaire pour les diffuseurs intermédiaire et centre. Trois essais pour chaque mesure. L'erreur est exprimée en écart-type.*

Pour le design d'un nouveau bioréacteur, la position intermédiaire du diffuseur devrait être retenue comme étant celle qui, pour un même débit, permet d'obtenir le  $K_{La}$  le plus

élevé. Le bioréacteur actuel ne permettait plus l'ajout de diffuseurs supplémentaires mais comme nous l'avons constaté, l'utilisation de plusieurs diffuseurs ou de diffuseurs ayant une plus grande surface permet d'améliorer le transfert d'oxygène. Par conséquent, l'installation de plusieurs diffuseurs en parallèle placés en position intermédiaire devrait être envisagée lors de la conception d'un nouveau bioréacteur.

## 6. CULTURES À HAUTE DENSITÉ CELLULAIRE EN BIORÉACTEUR

### 6.1. Culture en cuvée

Avant de présenter les résultats des cultures à haute concentration cellulaire effectuées en cuvée alimentée, nous examinerons les résultats obtenus pour une culture en cuvée type en flacon de 500 ml. La culture F6-4, présentée à la Figure 6.1, est une des cultures témoins de la culture R6. Ces cultures en cuvée, effectuées dans du milieu B5 standard (Annexe A.3.1), étaient établies pour vérifier la qualité de l'inoculum du bioréacteur.

Cette culture en cuvée a permis d'obtenir une concentration en biomasse sèche de 15,3 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> à partir d'une concentration initiale de 2,8 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> (Figure 6.1). Cette valeur se compare avec celles obtenues par Aubry et Sirois pour des cultures en cuvée. Dans des cultures en flacons, effectuées dans du milieu B5 standard, Aubry a obtenu des concentrations en biomasse sèche variant de 6,6 à 14,7 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>. En bioréacteur, toujours avec du milieu B5, il a obtenu des concentrations variant de 6,2 à 9,2 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> (Aubry, 1995). Sirois pour sa part a obtenu une concentration de 12 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> pour une culture en bioréacteur dans du milieu B5 standard avec un ajout d'ammonium (8,5 mM) et de phosphate (1,6 mM) après 60 heures de culture (Sirois, 1997).

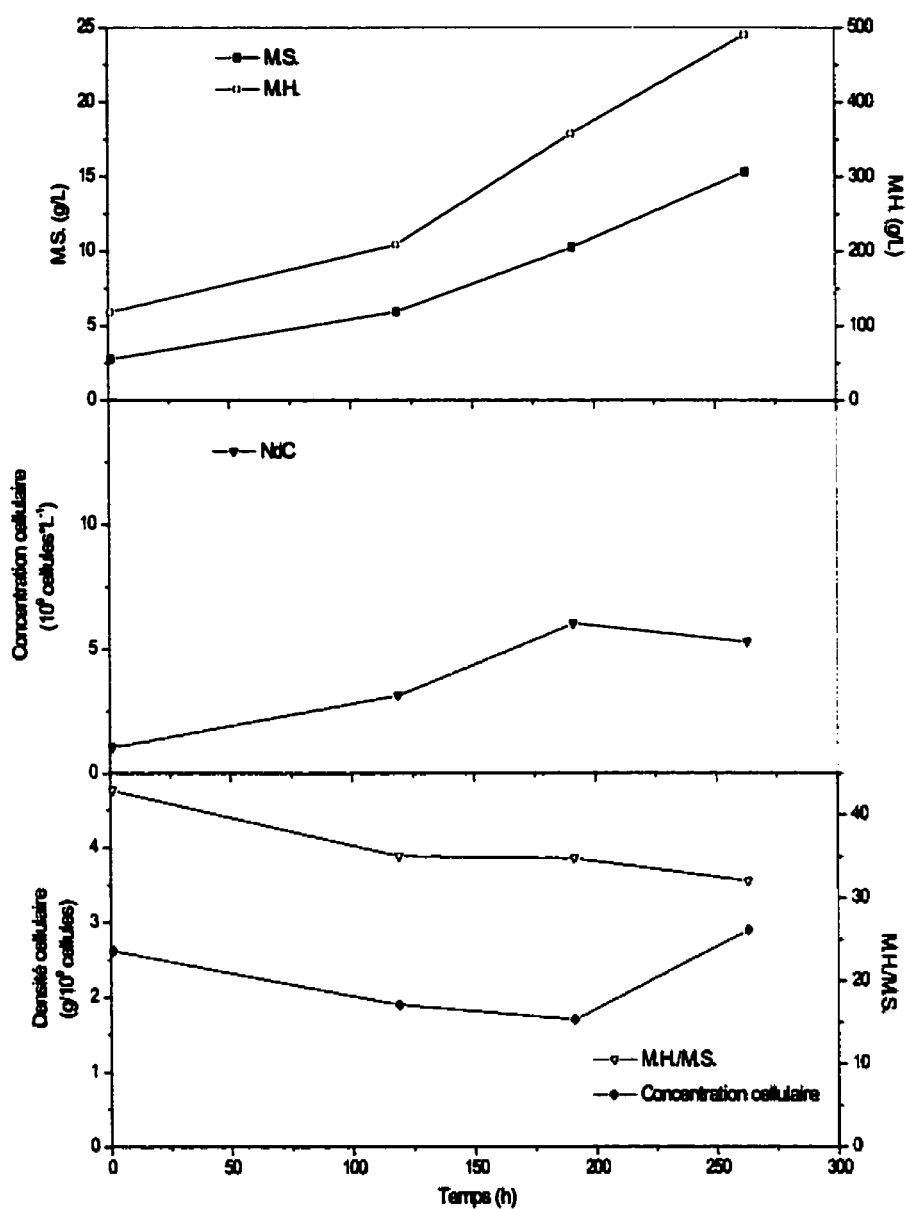


Figure 6.1 – Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et de la densité cellulaire pour la culture F6-4.

La concentration en biomasse humide a atteint une valeur de  $490 \text{ g M.H.}\cdot\text{L}^{-1}$ . Le rapport masse humide/masse sèche est assez élevé puisqu'il se maintient au dessus de 30. La

concentration cellulaire par contre est assez faible puisque seulement  $5,3 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> ont été obtenues à partir d'une concentration de  $1,1 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup>. À titre de comparaison, Sirois dans sa culture en cuvée en bioréacteur a obtenue une concentration de  $4,0 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> (Sirois, 1997). La densité cellulaire par contre est assez élevée puisque sa valeur la plus faible est de 1,7 g M.S./10<sup>9</sup> cellules.

Le taux de croissance global pour la biomasse est de 0,16 j<sup>-1</sup>, ce qui correspond à un temps de division de 106 heures. Le taux de croissance cellulaire est de 0,15 j<sup>-1</sup>, correspondant à un temps de division de 113 heures.

L'évolution de la concentration des principaux nutriments est présentée à la Figure 6.2. L'ammonium est consommé en environ 120 heures par les cellules. Le nitrate pour sa part demeure un peu plus longtemps dans le milieu puisqu'il est entièrement consommé après environ 190 heures. Ce qui veut dire qu'après 190 heures, soit environ 8 jours, il n'y a plus aucune source d'azote disponible dans le milieu de culture. Le phosphate disparaît également rapidement puisqu'après 120 heures, il n'en reste plus dans le milieu.

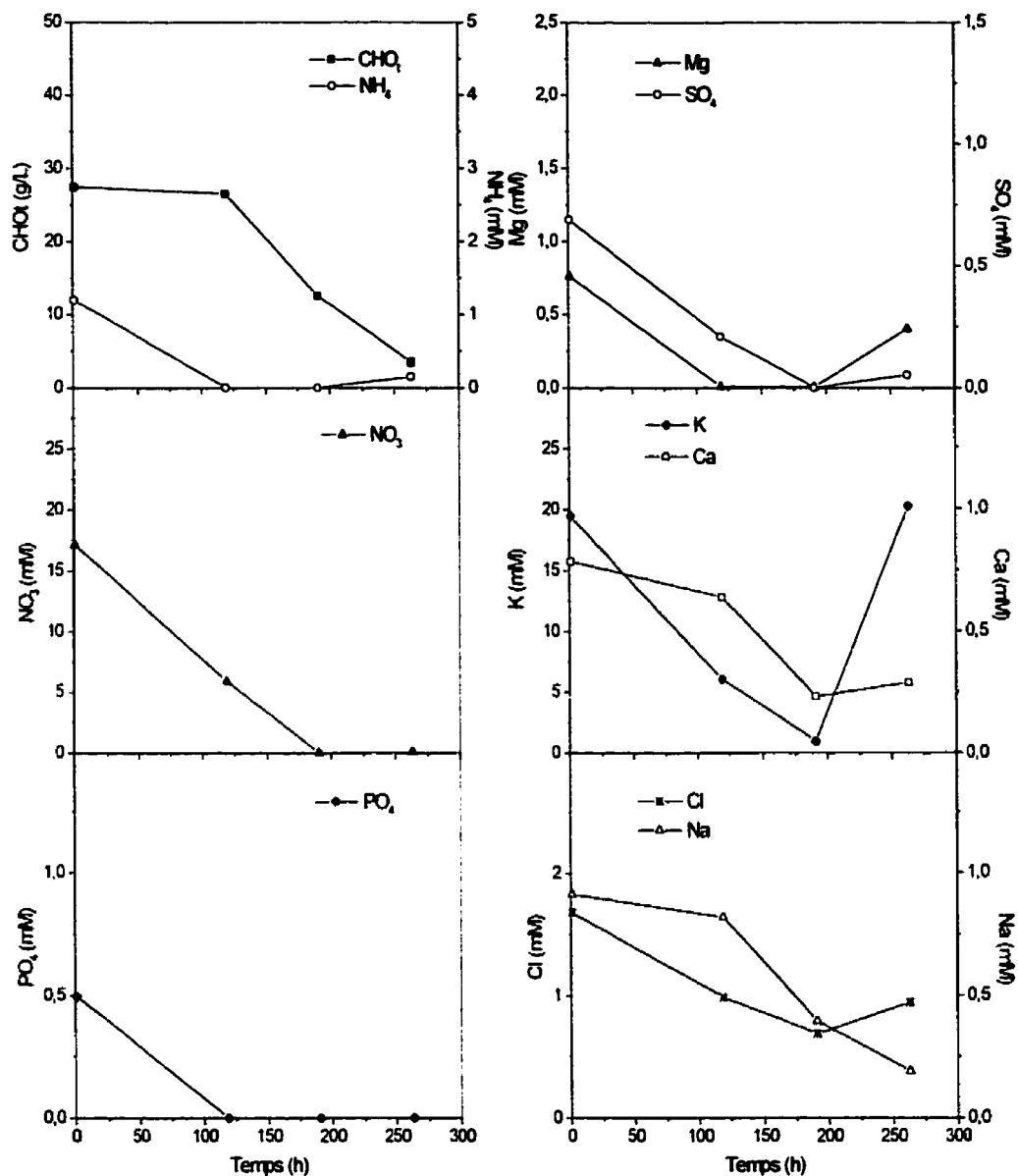


Figure 6.2 – Courbes de consommation des nutriments pour la culture F6-4.

Le magnésium a entièrement absorbé après 120 heures. Le sulfate demeure un peu plus longtemps dans le milieu mais il a entièrement disparu en 200 heures. Le calcium, le

sodium et le chlore sont légèrement consommés mais leur concentration ne tombe jamais à zéro. Pour sa part, le potassium est absorbé en début de culture et sa concentration tombe à zéro après 200 heures. Par contre, il est largement relargué en fin de culture. Pour conclure, on peut dire qu'une culture en cuvée peut difficilement durer plus de 8 jours parce qu'après ce temps, la plupart des nutriments ont été entièrement consommés.

## **6.2. Cultures à hautes densités cellulaires**

L'objectif principal de nos travaux était d'obtenir une suspension à haute densité cellulaire pour améliorer la productivité des cultures de cellules de plantes. Sirois avait déjà atteint, à l'aide du modèle qu'il a développé, une concentration de  $20 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup>, lors de sa meilleure culture. Cette concentration a donc été choisie comme objectif à atteindre. Cependant, lors de cette culture, des problèmes de transfert d'oxygène sont à l'origine de la limitation de la densité cellulaire. Les modifications apportées au bioréacteur (Chapitre 5) devaient permettre de contourner cette difficulté et d'obtenir des cultures à haute densité cellulaire. Nos travaux visent donc essentiellement à tester le modèle développé par Sirois et démontrer qu'une concentration de  $20 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> peut être obtenue de manière répétitive.

### 6.2.1. Cultures en bioréacteur

Les principaux résultats des cultures en bioréacteur sont présentés au Tableau 6.1. Ce tableau illustre les concentrations en biomasse sèche, humide et en nombre de cellules à l'inoculation; les concentrations maximales en biomasse sèche, humide et en nombre de cellules; le taux de croissance de la biomasse sèche et des cellules ainsi que la durée de la culture.

Les trois premières cultures ont été effectuées avec le modèle développé par Sirois et les mêmes points de consigne pour le nitrate, l'ammonium et le phosphate que ceux utilisés pour sa meilleure culture. Il a été remarqué assez rapidement qu'à haute concentration en biomasse humide, la viscosité de la suspension augmentait rapidement, ce qui causait une forte agglomération des bulles à la sortie des diffuseurs. Le transfert d'oxygène dans ces cultures était donc limité et par conséquent des concentrations cellulaires au dessus de  $15 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> ne pouvaient pas être obtenues. Pour cette raison, dans la culture R5, un ajout de mannitol a été effectué pour augmenter la pression osmotique du milieu et limiter la croissance de la biomasse humide. Cet ajout n'a pas permis de limiter la croissance de la biomasse humide. De plus, la quantité de nitrate alimentée à la culture n'était pas suffisante puisque la concentration de cet ion tombait souvent à zéro.

Une deuxième stratégie de culture a donc été élaborée. Il s'agissait de préparer les solutions d'ajout dans du milieu B5 complet pour éviter que certains ions secondaires consommés par les cultures disparaissent du milieu. De plus, le point de consigne pour le glucose a été augmenté à 15 g/L et le point de consigne pour le nitrate a été augmenté



à 3 mM. Cette culture a encore conduit à l'obtention d'une concentration en biomasse humide très élevée. Par conséquent, une troisième stratégie d'alimentation a été développée qui consistait à maintenir une concentration en ammonium en tout temps dans le milieu de croissance. Pour la culture R7, le point de consigne pour l'ammonium a été fixé à 1 mM. Malheureusement, l'ammonium étant consommé très rapidement, sa concentration est tombée à zéro en cours de culture. Encore une fois, la concentration en biomasse humide était très élevée. Par conséquent, pour la culture R9, le point de consigne pour l'ammonium a été augmenté à 3 mM et a même été augmenté à 5 mM en cours de culture pour éviter que l'ammonium soit entièrement consommé. Cette culture a permis d'obtenir la concentration cellulaire visée soit  $20 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup>.

Il est intéressant de remarquer que le taux de croissance de la biomasse est demeuré constant autour de  $0,14 \text{ j}^{-1}$ , peu importe la stratégie d'alimentation utilisée pour la culture. Par contre, le taux de croissance cellulaire est influencé par la stratégie d'alimentation. Les cultures ont permis d'atteindre une biomasse sèche variant entre  $16,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  et  $20,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Il est également intéressant de remarquer que la seule culture ayant permis d'atteindre la concentration cellulaire visée est celle où la biomasse humide a le moins augmentée. Il semble donc que le problème de transfert d'oxygène soit bien lié à la concentration en biomasse humide. Les résultats de chacune de ces cultures seront discutés en détail dans les sections suivantes.

Tableau 6.1 – Résumé des résultats de croissance obtenus pour les principales cultures en bioréacteur

	Concentration à l'inoculation			Concentration maximale			Taux de croissance global		Durée (h)	Commentaires
	Biomasse Sèche (g M.S.·L <sup>-1</sup> )	Biomasse humide (g M.H.·L <sup>-1</sup> )	Cellulaire (10 <sup>9</sup> cellules·L <sup>-1</sup> )	Biomasse Sèche (g M.S.·L <sup>-1</sup> )	Biomasse humide (g M.H.·L <sup>-1</sup> )	Cellulaire (10 <sup>9</sup> cellules·L <sup>-1</sup> )	Biomasse (j <sup>-1</sup> )	Cellulaire (j <sup>-1</sup> )		
R2	1,5	52,3	0,9	17,0	388	9,4	0,15	0,23	527	Mêmes conditions que la meilleure culture de Sirois. Très longue phase de latence (150 h.) parce que les ajouts de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> étaient trop importants.
R4	3,4	101	1,4	20,8	483	14,5	0,14	0,22	286	Mêmes conditions que R2 mais inoculation à une concentration plus élevée. La suspension est devenue très visqueuse limitant le transfert d'oxygène.
R5	3,1	85,9	1,5	16,5	378	7,3	0,15	0,18	330	Mêmes conditions que R4 mais ajout de 20 g/L de mannitol pour maintenir une pression osmotique, diminuer la taille des cellules et donc la viscosité. L'ajout de mannitol n'a pas réduit la viscosité.
R6	2,8	101	1,1	20,7	482	9,9	0,13	0,14	356	Pour ne pas diluer le milieu, les solutions d'ajout sont préparées dans du milieu B5. Le point de consigne du glucose est augmenté à 15 g/L et celui du NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> à 3 mmol/L. La viscosité en fin de culture demeure élevée.
R7	2,6	91	0,9	20,8	418	11,2	0,14	0,20	355	Mêmes conditions que pour R6 sauf le point de consigne du NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> qui passe de 0,5 mM intracellulaire à 1 mM extracellulaire. La concentration en NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> est difficile à maintenir et la viscosité en fin de culture demeure élevée.
R9	2,0	80	0,9	18,7	313	20,2	0,14	0,19	475	Mêmes conditions que R7 sauf le point de consigne du NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> qui est augmenté à 3 mM. La concentration en NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> n'est jamais tombée à zéro ce qui a permis de diminuer la taille des cellules et donc la viscosité.

### 6.2.2. Cultures témoins en flacons

Pour chacune des cultures, des flacons témoins étaient inoculés pour vérifier la qualité de l'inoculum. Deux types de cultures en flacons ont été effectuées. Dans un premier temps, deux flacons étaient inoculés en même temps que le bioréacteur et recevaient les mêmes ajouts proportionnellement au volume de culture. À partir de la culture R5, des cultures en cuvée ont également été établies pour vérifier la qualité de l'inoculum employé pour initier la culture en bioréacteur. Les principaux résultats de croissance de ces cultures en flacons sont présentés à l'annexe A.4.

Ces cultures en cuvée effectuées en flacons ont permis d'établir que les cellules employées pour inoculer le bioréacteur croissaient en biomasse et en nombre de cellules. Ces cultures atteignaient une concentration cellulaire entre  $3 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> et  $6 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> pour une biomasse sèche variant entre 9 g M.S.·L<sup>-1</sup> et 15 g M.S.·L<sup>-1</sup>. Pour ce qui est des cuvées alimentées la concentration cellulaire variait entre  $6,5 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> et  $10 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup>. Cette valeur est plus élevée que dans le cas des cultures en cuvée mais moins que dans le bioréacteur. La biomasse sèche variait entre 9 g M.S.·L<sup>-1</sup> et 17 g M.S.·L<sup>-1</sup>, ce qui s'approche de ce qui a été obtenu dans les cultures en cuvée.

Par conséquent, les cultures en cuvée alimentée permettent d'obtenir une concentration cellulaire plus élevée que les cultures en cuvée pour une biomasse sèche équivalente. Les cultures en cuvée alimentée ne permettent pas d'obtenir des concentrations cellulaires aussi élevées qu'en bioréacteur, probablement à cause d'une limitation du

transfert d'oxygène. Il faut remarquer que dans le cas de la culture en flacon F9-1, le maintien d'une concentration en ammonium dans le milieu a eu un effet négatif sur la croissance cellulaire et la production de biomasse. En effet, l'ammonium avait tendance à s'accumuler dans le milieu et a atteint une concentration de 34 mM en fin de culture. Or, l'ammonium à aussi haute concentration est toxique. Les différences dans le transfert d'oxygène en flacons et en bioréacteur expliquent le fait que les cellules cultivées en flacon n'absorbent pas l'ammonium aussi rapidement que celles cultivées en bioréacteur.

### **6.3. Première stratégie de culture**

#### **6.3.1. Culture R2 : Stratégie d'alimentation de Sirois**

Cette culture a été effectuée en utilisant l'approche et le modèle de Sirois avec les mêmes paramètres que ceux qu'il avait utilisés pour sa meilleure culture. Ces paramètres sont les concentrations minimales de glucose, ammonium, nitrate et phosphate à maintenir en tout temps dans le bioréacteur. Ces concentrations sont fixées à  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose, 1 mM de nitrate, 0,02 mM d'ammonium intracellulaire et 0.05 mM de phosphate intracellulaire. Les concentrations intracellulaires sont estimées par le modèle. Les graphiques des principaux résultats pour la culture R2 sont présentés aux Figures 6.3, 6.4 et 6.5.

Une phase de latence dans la croissance de la biomasse d'environ 70 heures est observée en début de culture (évaluée sur un graphique semi-log). Ce délai est en partie attribuable à une inoculation très faible de la culture soit  $1,5 \text{ g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$ . Par la suite, la croissance suit une courbe exponentielle jusqu'à une concentration de  $17,0 \text{ g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$ . La courbe de la croissance cellulaire illustre que les cellules ont commencé à diviser très rapidement puis, la concentration cellulaire a diminué après 50 heures (évaluée sur un graphique semi-log). Cette mortalité est suivie d'une faible croissance puis d'une phase de latence entre 150 et 250 heures (évaluée sur un graphique semi-log). Ainsi il y a un délai d'environ 250 heures avant que la concentration cellulaire augmente de façon exponentielle. La culture a permis d'obtenir, après 325 heures, une concentration de  $9,4\cdot 10^9 \text{ cellules}\cdot\text{L}^{-1}$  à partir d'une concentration initiale de  $0,9\cdot 10^9 \text{ cellules}\cdot\text{L}^{-1}$ . Par la suite, une importante mortalité des cellules a été observée. Si la phase de latence est négligée, le taux de croissance cellulaire global est de  $0,23 \text{ j}^{-1}$  ce qui correspond à un temps de division de 73 heures. Dans les mêmes conditions, le taux de croissance pour la biomasse est de  $0,15 \text{ j}^{-1}$ , ce qui donne un temps de division de 110 h.

L'alimentation en azote peut expliquer que la croissance cellulaire ainsi que la croissance en biomasse aient été limitées. Les ajouts en  $\text{NH}_4^+$  étaient beaucoup trop importants parce que, par erreur, la concentration de la solution d'ajout était 2 fois plus élevée que ce qui avait été prévu. Les ajouts trop élevés d'ammonium ont causé une accumulation de cet ion dans le milieu de culture entre 50 et 175 heures. En particulier, après 67 heures de culture, la concentration en ammonium est montée à 11 mM. Le

même phénomène s'est reproduit après 120 heures de culture, la concentration ayant atteint 9,8 mM. Or, des concentrations en ammonium aussi élevées en début de culture, donc à faible concentration cellulaire ( $1 \cdot 10^9$  cellules $\cdot$ L $^{-1}$ ), peuvent ralentir la croissance.

La croissance de la biomasse a repris après 125 heures. La culture a cependant manqué d'azote plusieurs fois entre 125 et 250 heures. La concentration en nitrate devait être maintenue au dessus de 1 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ , cette condition n'a pas été respectée. Ceci peut être expliqué par le fait que le modèle n'a pas pu prévoir correctement la croissance de la culture à cause de la longue phase de latence et a donc sous-estimé les ajouts d'azote nécessaires. En effet, le modèle est conçu pour modéliser une culture en phase exponentielle de croissance. La disparition de toutes les sources d'azote du milieu a pu causer le retard dans la croissance cellulaire jusqu'à 250 heures. Par contre, en fin de culture, le nitrate s'accumule dans le milieu de culture. Ceci peut être attribué aux ajouts d'ammonium, deux fois trop concentrés. Les cellules, gorgées en ammonium, consommaient moins de nitrate que ce qui était prévu par le modèle.

La concentration en glucides devait être maintenue au dessus de 10 g $\cdot$ L $^{-1}$  au cours de la culture. Cette condition est respectée tout au long de la culture. Le phosphate a également été rapidement consommé tout au long de la culture. Il est difficile de préciser si le modèle prévoit des ajouts suffisants de phosphate puisque le critère d'ajout est intracellulaire.

Le magnésium, le sulfate et le chlore ont été épuisés dans les 250 premières heures de culture. Le calcium aussi a été consommé. Le potassium, pour sa part, a maintenu sa concentration. L'augmentation de la concentration en potassium en fin de culture peut être attribuée à d'importants ajouts de nitrate et de phosphate. En effet, le potassium est ajouté comme contre ion avec le nitrate et le phosphate. Pour sa part, le sodium a été relargué en grande quantité après 300 heures de culture.

Cette culture nous a permis de constater la différence entre le profil de croissance de la biomasse et celui de la concentration cellulaire. En effet, la division cellulaire arrête avant la croissance de la biomasse, ce qui montre qu'une fois la division cellulaire arrêtée les cellules grossissent. De plus, le suivi de la biomasse ne reflète pas l'importante mortalité qui est observée en dénombrant les cellules, ce qui démontre que la biomasse n'illustre pas à elle seule l'ensemble des phénomènes se produisant dans une culture. Dans ses travaux Pépin (1996) avait déjà constaté un comportement semblable chez les cellules de *Vitis vinifera*.

La concentration cellulaire trop faible à l'inoculation et les ajouts massifs de  $\text{NH}_4^+$  en début de culture, alors que la concentration cellulaire était d'environ  $1 \cdot 10^9$  cellules- $\text{L}^{-1}$ , ont causé un long délai dans la croissance de la biomasse en début de culture. Le modèle, qui est conçu pour prévoir la croissance et les besoins en nutriments d'une culture en croissance exponentielle, a donc éprouvé des difficultés. Lorsque la culture a commencé à croître, le modèle n'a pas prévu un ajout suffisant de nitrate, par la suite les ajouts ont été surévalués. La pénurie d'azote a causé un retard dans la croissance

cellulaire. Enfin, dans le cas du  $\text{PO}_4^{3-}$ , il est difficile de savoir si les ajouts étaient suffisants puisque le critère était intracellulaire.

Les concentrations de plusieurs ions dont le  $\text{NO}_3^-$ , le  $\text{NH}_4^+$ , le  $\text{Mg}^{2+}$ , le  $\text{SO}_4^{2-}$  et le  $\text{Cl}^-$  sont tombées à zéro avant la fin de la culture. La pénurie de ces ions pourrait avoir causé l'arrêt de la division cellulaire.



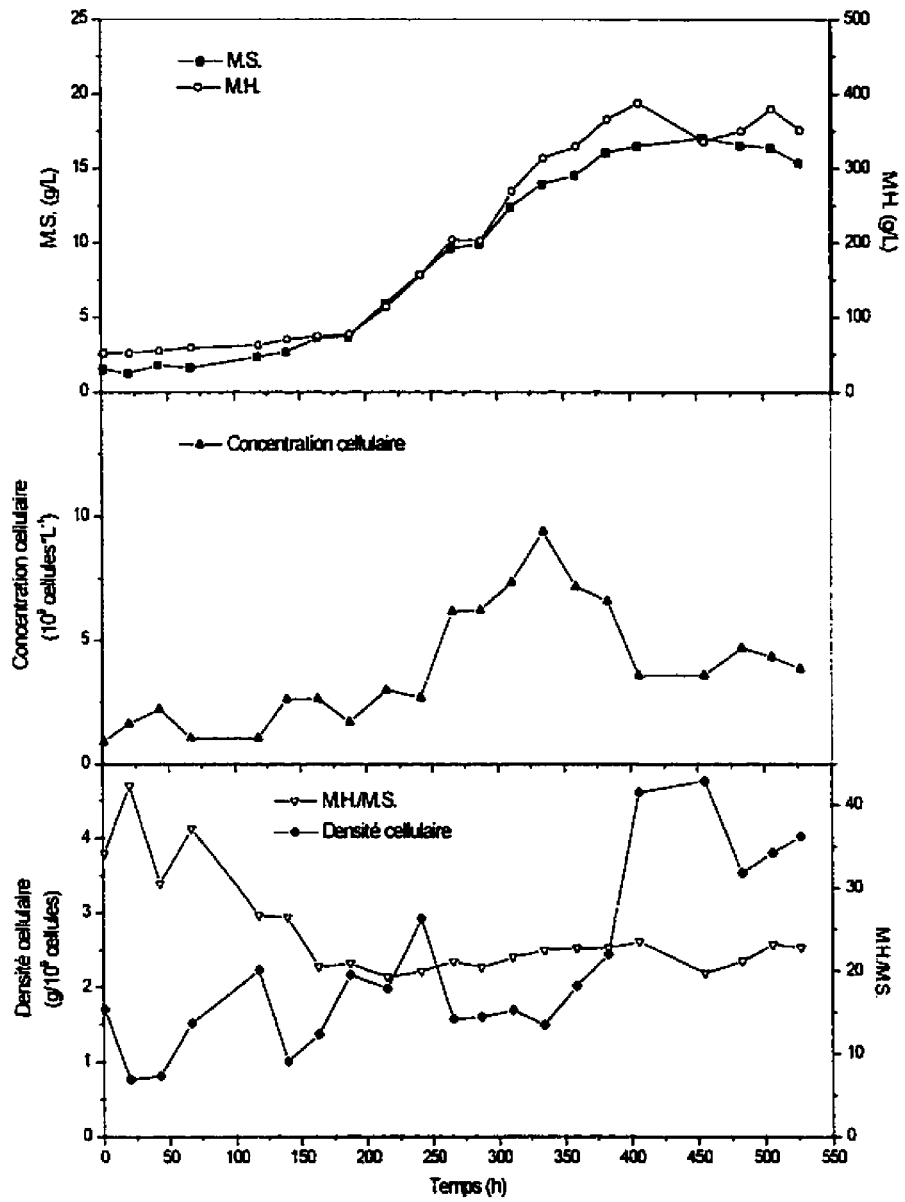


Figure 6.3 - Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et de la densité cellulaire pour la culture R2.

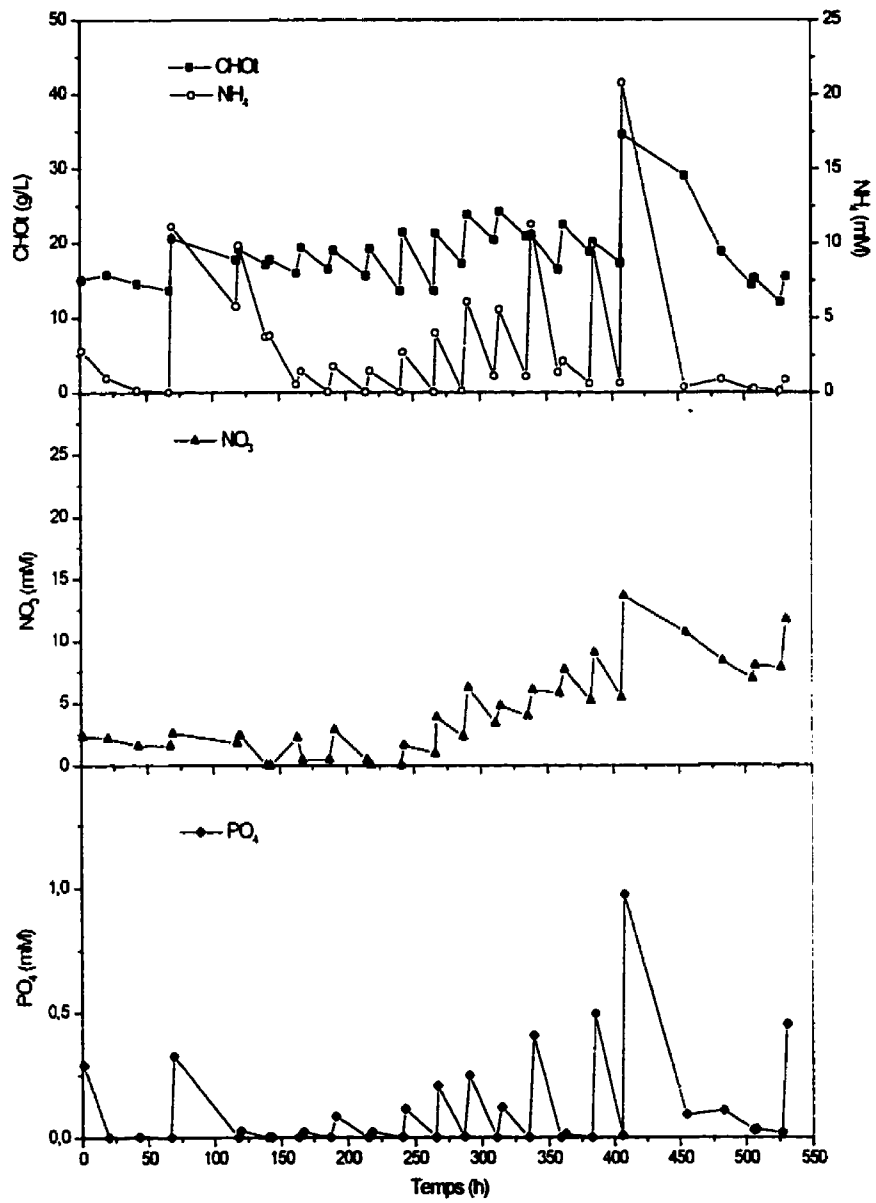


Figure 6.4 - Courbes de consommation des principaux nutriments pour la culture R2.

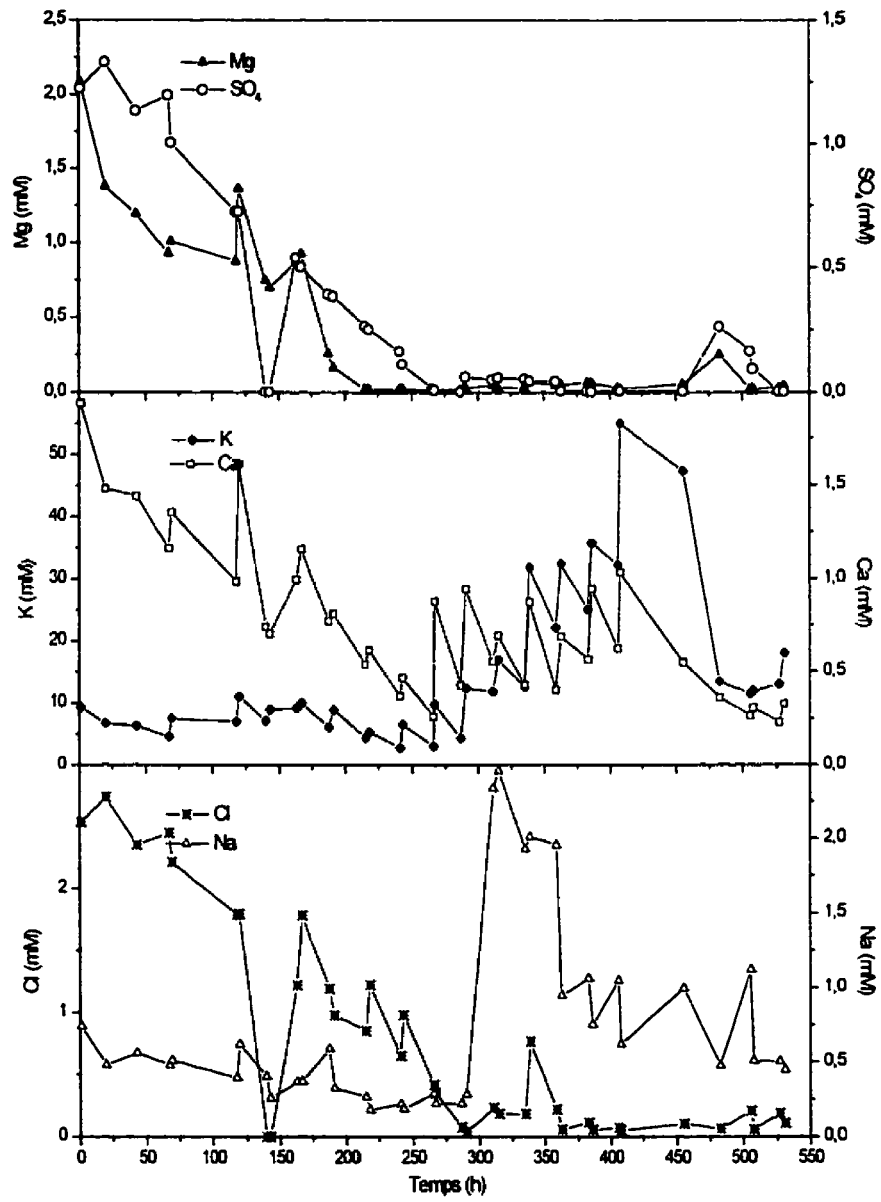


Figure 6.5 - Courbes de consommation des macronutriments secondaires pour la culture R2

### 6.3.2. Culture R4 : augmentation de l'inoculum

Suite aux résultats de la culture R2, la culture R4 a été inoculée à plus haute densité (3,4 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>). Cette concentration se rapproche plus de la concentration de départ qu'utilisait Sirois. Les points de consigne pour le modèle sont restées les mêmes que pour la culture précédente soit : 10 g $\cdot$ L<sup>-1</sup> de glucose, 1 mM de nitrate , 0,2 mM d'ammonium intracellulaire et 0,05 mM de phosphate intracellulaire. Les graphiques des principaux résultats pour la culture R4 sont présentés aux Figures 6.6 à 6.10.

La phase de latence pour la biomasse est beaucoup plus courte que lors de la culture précédente. La concentration d'inoculation plus élevée et la correction de la concentration de la solution d'ajout d'ammonium sont probablement responsables de la diminution de la phase de latence. En effet, elle n'est plus que de 20 heures (évaluée sur un graphique semi-log). Par contre, après 90 heures de culture une erreur du contrôleur des débits d'air et d'oxygène a provoqué une chute de la concentration en oxygène dissous dans le milieu à zéro toute une nuit. Cette chute a causé un arrêt de la croissance qui a repris par la suite. La culture a tout de même atteint 20,8 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup> à partir d'une concentration initiale de 3,4 g M.S. $\cdot$ L<sup>-1</sup>.

La phase de latence de 90 heures en début de culture (évaluée sur un graphique semi-log) est plus longue dans le cas de la concentration cellulaire montrant que les cellules ont grossi avant de se diviser. La division cellulaire, tout comme la croissance de la biomasse, a été affectée par la chute de l'oxygène dissous puisque la division s'est

arrêtée pendant environ 100 heures. Une concentration de  $14,5 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> a été atteinte à partir d'une concentration de  $1,4 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup>. La mortalité en fin de culture ne se reflète pas sur le suivi de la croissance de la biomasse, ce qui confirme que les cellules grossissent quand elles arrêtent de se diviser. Le même phénomène avait été observé lors de la culture R2. Le taux de croissance global pour le nombre de cellules est de  $0,22 \text{ j}^{-1}$ , ce qui correspond à un temps de division de 77 heures. Le taux de croissance pour la biomasse est de  $0,14 \text{ j}^{-1}$ , ce qui correspond à un temps de division de 120 h.

La concentration en glucides a été maintenue au dessus de 10 g/L comme le prévoyait le modèle. L'ammonium est consommé très rapidement après chaque ajout comme lors de la culture précédente. Encore une fois, l'ion nitrate a été largement consommé. La concentration est souvent tombée sous la consigne qui était de 1 mM. La concentration en nitrate est même tombée à zéro plusieurs fois pendant la culture, ce qui a pu causer une pénurie d'azote pour les cellules. Il semble que le modèle sous-estime les besoins en azote des cellules lors de la phase de croissance même si la phase de latence a été raccourcie. Le phosphate est entièrement consommé en 24 heures, ce qui est normal puisque le critère de concentration est intracellulaire.

Le magnésium est entièrement disparu après 50 heures de culture. Le sulfate, quant à lui, a été consommé dans les 150 premières heures. Un ajout de  $\text{MgSO}_4$  effectué à 170 heures, a été rapidement absorbé lui aussi. Le chlore est aussi consommé mais moins rapidement. Il faut environ 225 heures avant qu'il ait entièrement disparu. La concentration en calcium a diminué en cours de culture. La concentration de sodium a

légèrement diminué pendant la culture. Pour ce qui est du potassium, sa concentration s'est maintenue entre 2 et 7 mmol·L<sup>-1</sup> tout au long de la culture.

La culture R4 a permis d'obtenir une concentration cellulaire de  $14,5 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup>. Malheureusement, cette concentration n'a pas été maintenue. En effet, dès que la biomasse humide dépasse le seuil de 350 g·L<sup>-1</sup>, la suspension devient très visqueuse. La viscosité de la suspension était facilement observable lors de la prise d'échantillon. Les effets étaient aussi clairement visibles dans le bioréacteur. En effet, les bulles étaient beaucoup plus grosses qu'en début de culture. La taille des bulles peut être expliquée par un important phénomène de coalescence des bulles à la sortie du diffuseur. Le  $K_La$  s'en trouvait donc diminué de deux façons. En effet, la viscosité de la suspension limite le transfert d'oxygène. De plus, la surface d'échange se trouve à être diminuée puisque le diamètre des bulles augmente.

Le  $K_La$  en début de culture oscillait autour d'une valeur de 1,5 h<sup>-1</sup>, il a ensuite augmenté pour atteindre en fin de culture une valeur de 3,4 h<sup>-1</sup>. Il semble que la présence de cellules ait un effet important sur le  $K_La$ . En effet, si on compare le  $K_La$  obtenu en culture avec celui qui aurait été obtenu pour le même débit d'air dans de l'eau ( $K_{La0}$ ), on constate que le  $K_La$  en culture est toujours plus faible d'environ 40%. Ceci peut être expliqué par la viscosité de la suspension cellulaire ainsi que par l'osmolarité plus élevée du milieu de culture.

Les cellules lors de cette culture poussaient plus rapidement que ce que prévoyait le modèle. Ceci peut expliquer le fait que les ajouts de nitrate n'aient pas été suffisants. Pour ce qui est de l'ammonium, le critère intracellulaire nous empêche de savoir si les cellules en ont manqué. La culture a également manqué d'ions  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  et  $Cl^-$ . L'ajout de  $MgSO_4$  après 175 heures a été très rapidement consommé. Ces ions ne sont peut-être pas fournis en quantités suffisantes dans le milieu initial. Des ajouts au besoin devraient donc être prévus en cours de culture.

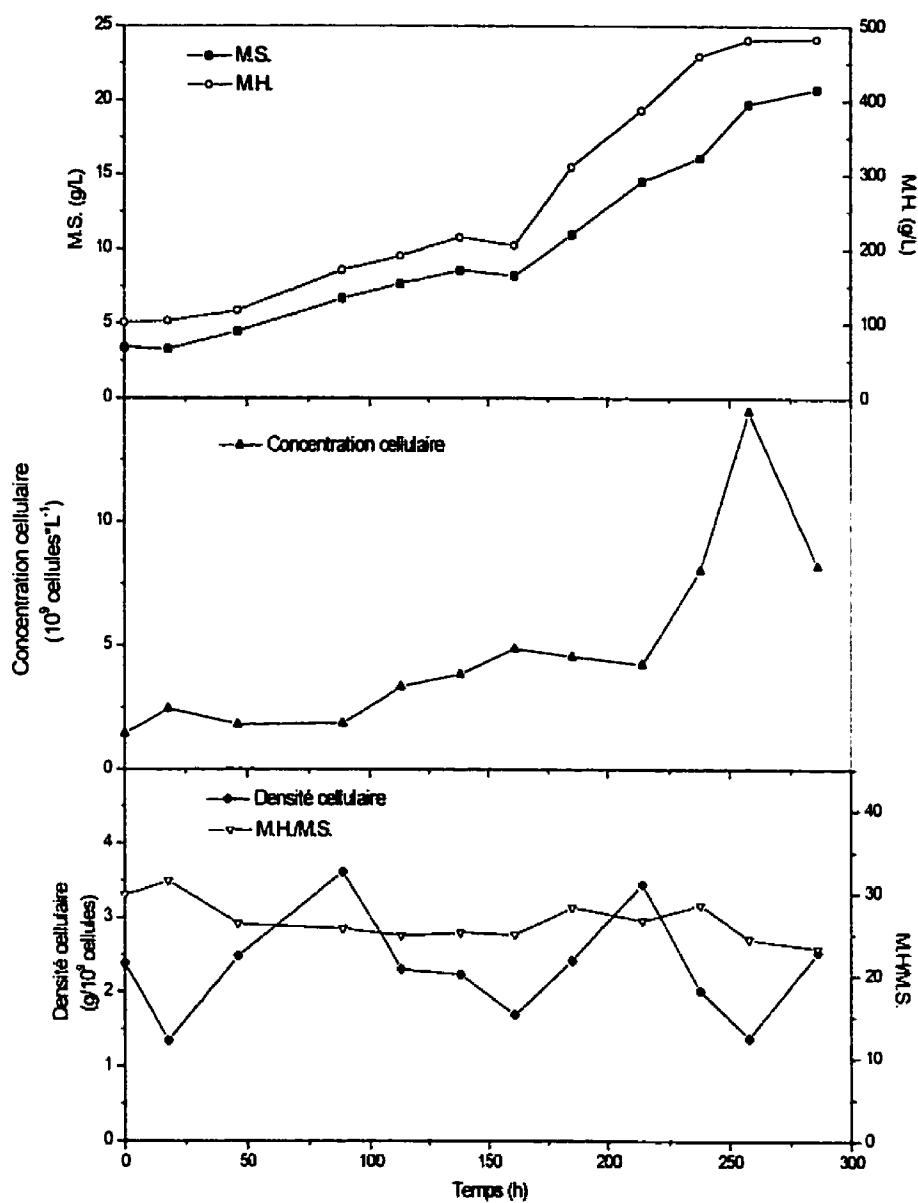


Figure 6.6 - Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et de la densité cellulaire pour la culture R4.



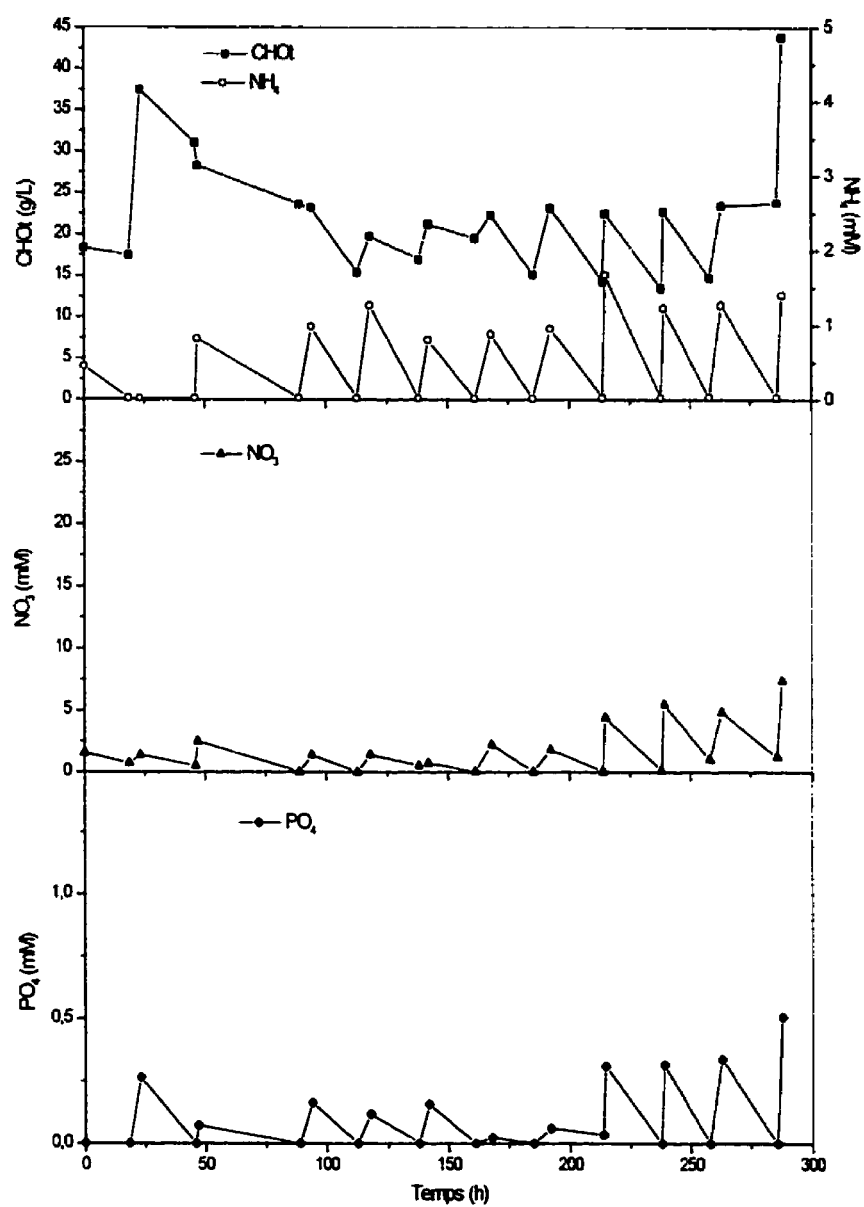


Figure 6.7 - Courbes de consommation des principaux nutriments pour la culture R4.

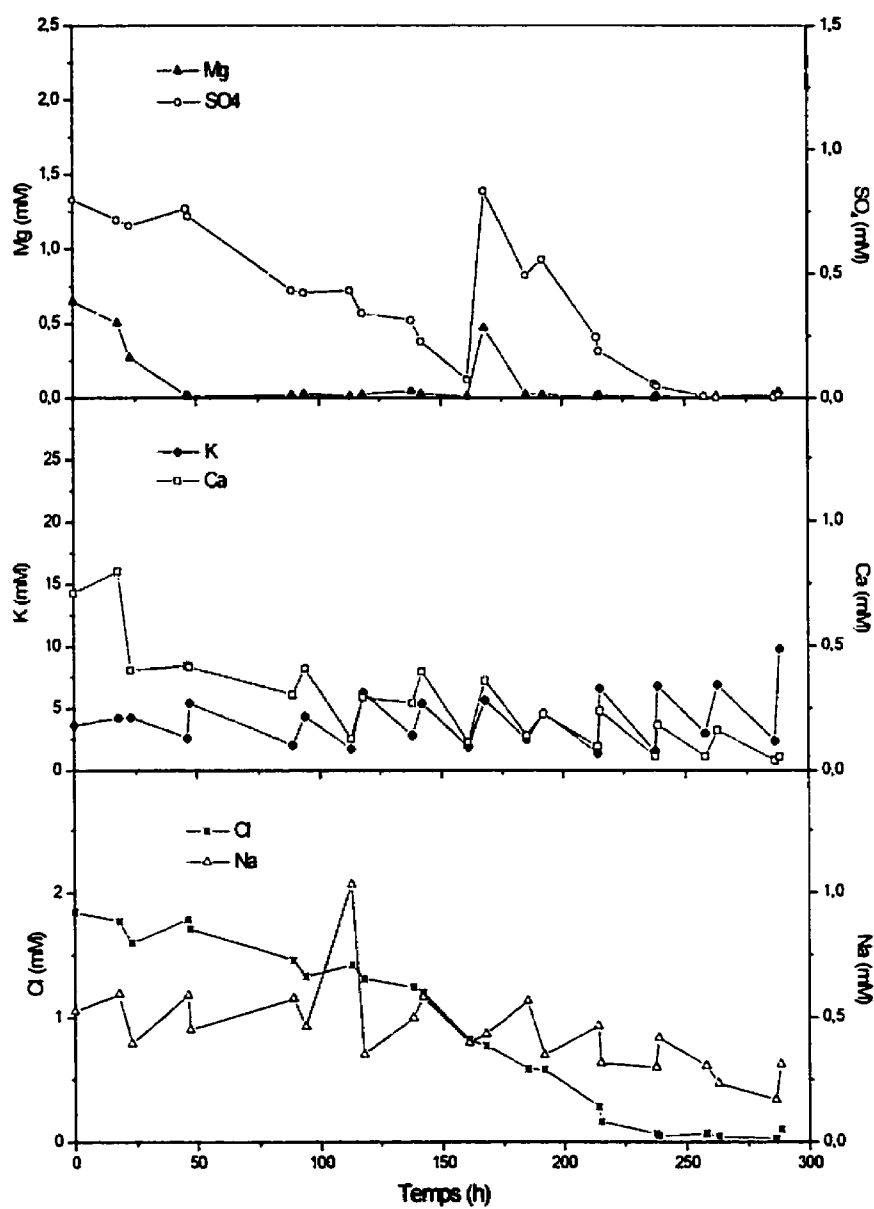


Figure 6.8 – Courbes de consommation des macronutriments secondaires pour la culture R4.

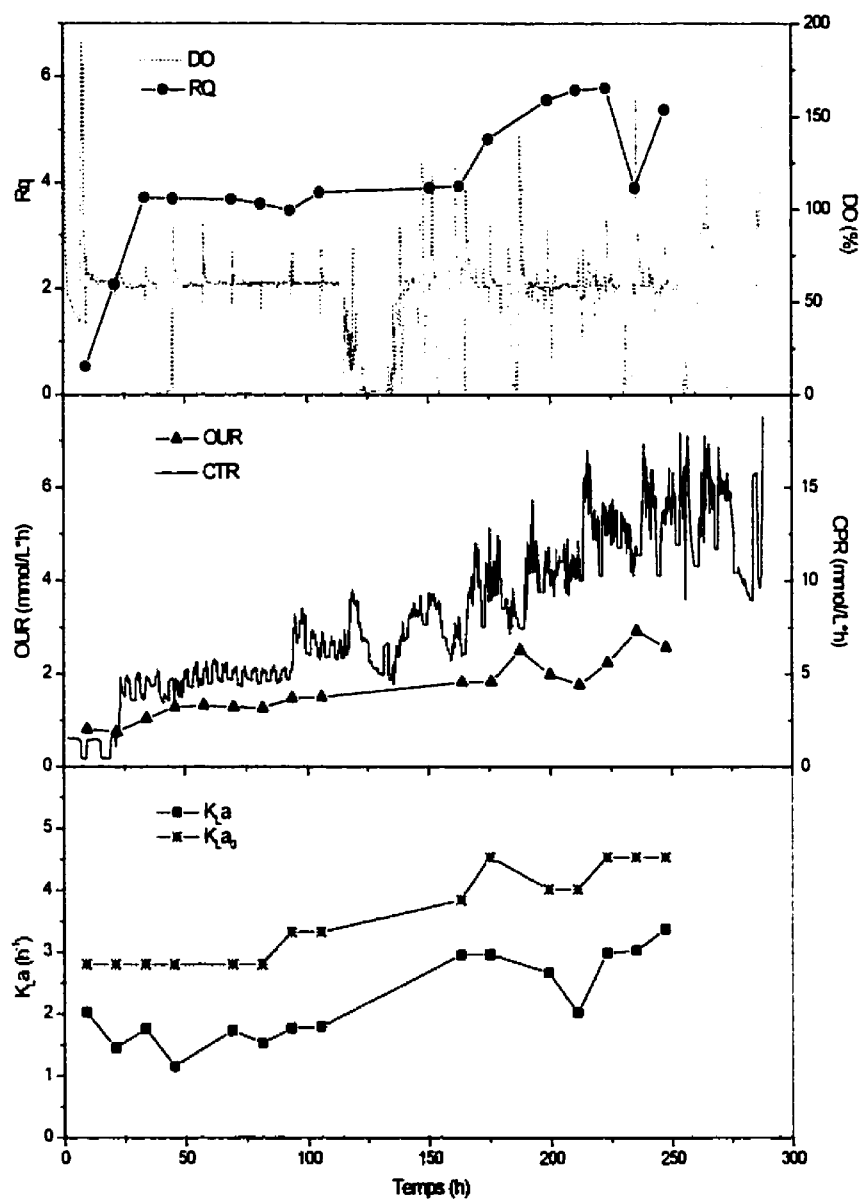


Figure 6.9 – Quotient respiratoire, concentration en oxygène dissous, taux de consommation d'oxygène, taux de production de  $\text{CO}_2$  et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture R4.

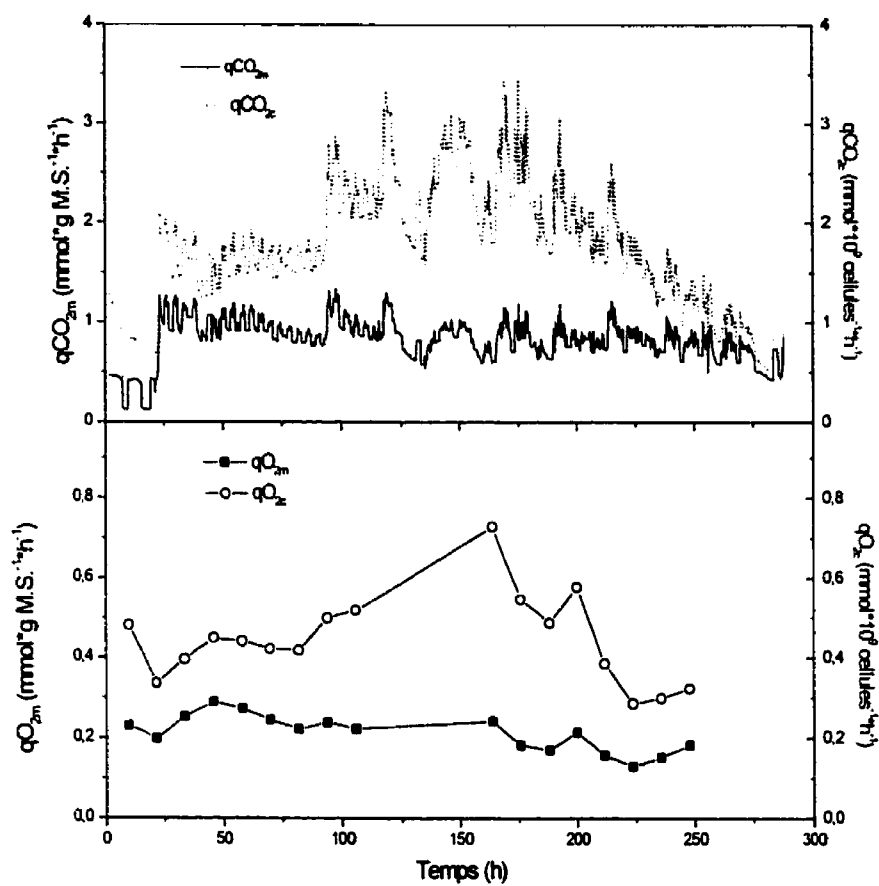


Figure 6.10 - Taux spécifiques de consommation de l'oxygène et de production de CO<sub>2</sub> pour la culture R4

### 6.3.3. Culture R5 : Effet de l'augmentation de l'osmolarité

La culture précédente ayant démontré que la viscosité de la suspension cellulaire limitait le transfert d'oxygène, un ajout de  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de mannitol au milieu de culture initial a été effectué. Ce sucre n'étant pas métabolisé par les cellules végétales, il permet de maintenir une plus haute pression osmotique, ce qui devait permettre de diminuer la taille des cellules et donc leur masse humide et la viscosité de la suspension cellulaire. Les points de consigne du modèle sont demeurés les mêmes que pour les cultures précédentes soit :  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose,  $1 \text{ mM}$  de nitrate,  $0,2 \text{ mM}$  d'ammonium intracellulaire et  $0,05 \text{ mM}$  de phosphate intracellulaire. Les graphiques des principaux résultats pour la culture R5 sont présentés aux Figures 6.11 à 6.15.

La phase de latence pour la biomasse au début de la culture est d'environ 65 heures (évaluée sur un graphique semi-log). La culture a permis d'obtenir une concentration de  $16,5 \text{ g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$  à partir d'une concentration de  $3,1 \text{ g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$ . Malheureusement, la concentration en masse humide a encore atteint une valeur très élevée  $378 \text{ g M.H.}\cdot\text{L}^{-1}$ , ce qui est au dessus du seuil de  $350 \text{ g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$  où le transfert d'oxygène commence à être limité. Il semble donc que la concentration en mannitol dans le milieu n'ait pas été suffisante pour permettre de limiter la taille des cellules.

Pour ce qui est de la concentration cellulaire, la phase de latence est courte, soit environ 50 heures (évaluée sur un graphique semi-log). Par la suite, la culture a permis d'obtenir  $7,3\cdot 10^9 \text{ cellules}\cdot\text{L}^{-1}$  en 275 heures. Cette concentration est très inférieure à celle obtenue

lors de la culture précédente. Le taux de croissance global pour le nombre de cellules est de  $0,18 \text{ j}^{-1}$ , ce qui correspond à un temps de division moyen de 93 heures. Ce taux de croissance cellulaire est inférieur à ce qui a été observé lors des cultures précédentes. Le taux global de croissance pour la biomasse est de  $0,15 \text{ j}^{-1}$ , ce qui correspond à un temps de division de 110 h; ces valeurs sont proches de celles observées auparavant.

La concentration en sucre a été maintenue au dessus de la consigne tout au long de la culture. Comme lors des cultures précédentes, l'ammonium a été rapidement absorbé après chaque ajout. Le nitrate aussi a été fortement consommé. La concentration en nitrate est d'ailleurs tombée à zéro plusieurs fois pendant la phase de croissance exponentielle. Encore une fois, la quantité d'azote à ajouter d'après le modèle sous-estime les besoins réels des cellules. Après la fin de la phase de croissance exponentielle, le nitrate s'accumule dans le milieu. De nombreux ions ayant complètement disparu du milieu de culture, il est possible que les cellules ne puissent pas absorber le nitrate parce qu'elles manquent de quelque chose. Le phosphate est toujours consommé en 24 heures par les cellules, ce qui est prévisible puisque le modèle prévoit que le phosphate doit être présent intracellulairement.

Le magnésium est encore une fois rapidement absorbé au début de la culture. Il est entièrement disparu après 75 heures. Un ajout, effectué après 260 heures, a lui aussi été consommé très rapidement. La disparition du magnésium du milieu de culture pourrait expliquer le fait que la croissance cellulaire était moins élevée par rapport à la culture précédente. En effet, l'ajout a été effectué beaucoup plus tard que lors de la culture R4

(260 heures au lieu de 170 heures). Le sulfate est demeuré dans le milieu un peu plus longtemps. Il a fallu 190 heures aux cellules pour l'absorber complètement. Un ajout de milieu B5 complet, sauf les sels majeurs et le sucre, a été effectué après 280 heures de culture. Le sulfate et le magnésium de cet ajout ont aussi été rapidement consommés. Le chlore, pour sa part, disparaît du milieu au même moment que le sulfate. Le chlore ajouté avec le milieu B5 en fin de culture a également été consommé. Les ions calcium et sodium n'ont pas été entièrement absorbés mais leur concentration a diminué pendant la culture. Le potassium a maintenu sa concentration tout au long de la culture. Il s'accumule cependant en fin de culture, ce qui correspond aux ajouts importants de nitrate puisque le potassium est ajouté comme contre ion.

Entre 50 et 100 heures de cultures, le  $K_{La}$  varie autour d'une valeur de  $2,0 \text{ h}^{-1}$ , il augmente ensuite pour atteindre  $3,6 \text{ h}^{-1}$  après 160 heures de culture. Après 160 heures, la valeur du  $K_{La}$  diminue graduellement. Tout comme lors de la culture précédente, on constate que la présence de la biomasse a un effet important sur le  $K_{La}$ . En effet, le  $K_{La}$  en culture est inférieur au  $K_{La0}$  d'environ 25% en début de culture. Cet écart semble encore s'accroître après 150 heures de culture, ce qui reflète l'augmentation de la biomasse. Après 250 heures de culture, on constate que la lecture de la sonde à oxygène dissous devient très instable. Ces difficultés coïncident avec le moment où la biomasse humide atteint un plateau à  $350 \text{ g M.H.}\cdot\text{L}^{-1}$ . Il semble donc que le fonctionnement de la sonde à oxygène dissous soit perturbé par la trop grande concentration en biomasse. Ceci a, bien entendu, un impact important sur le contrôleur d'oxygène dissous. Il est

donc encore une fois nécessaire de limiter l'augmentation de la biomasse humide en culture.

L'ajout de mannitol à la culture n'a pas permis de maintenir une pression osmotique suffisante pour diminuer la masse humide des cellules. Le modèle a encore une fois mal évalué la consommation en azote des cellules. Le problème est dû au fait que le modèle sous-estime la croissance de la biomasse sèche. Les marges de manœuvre pour l'ajout d'azote sont également excessivement serrées puisque même lorsque l'estimation de la biomasse est correcte, il arrive que les cellules manquent d'azote. Les erreurs dues à des inexactitudes sur la concentration de la solution d'ajout, sur le volume d'ajout ainsi qu'aux pertes dans la tubulure lors des ajouts pourraient alors être suffisantes pour que les cellules manquent de nitrate.

Cette culture a également manqué de  $Mg^{2+}$  et de  $SO_4^{2-}$ . Le  $MgSO_4$  a été ajouté trop tard pour éviter que la concentration tombe à zéro lors de la culture. Ceci est attribuable aux délais dans l'analyse du milieu de culture au HPLC. Un deuxième ajout de milieu B5 complet sauf le sucre, le  $NO_3^-$ , le  $NH_4^+$  et le  $PO_4^{3-}$ , effectué en fin de culture, n'a pas pu empêcher la concentration de  $Mg^{2+}$  et de  $SO_4^{2-}$  de tomber à zéro de nouveau. Cet ajout est également arrivé trop tard pour éviter le manque de  $Cl^-$ . La disparition de ces ions du milieu de culture pourrait expliquer la croissance cellulaire limitée. Il est donc nécessaire de développer une nouvelle approche pour les ajouts.



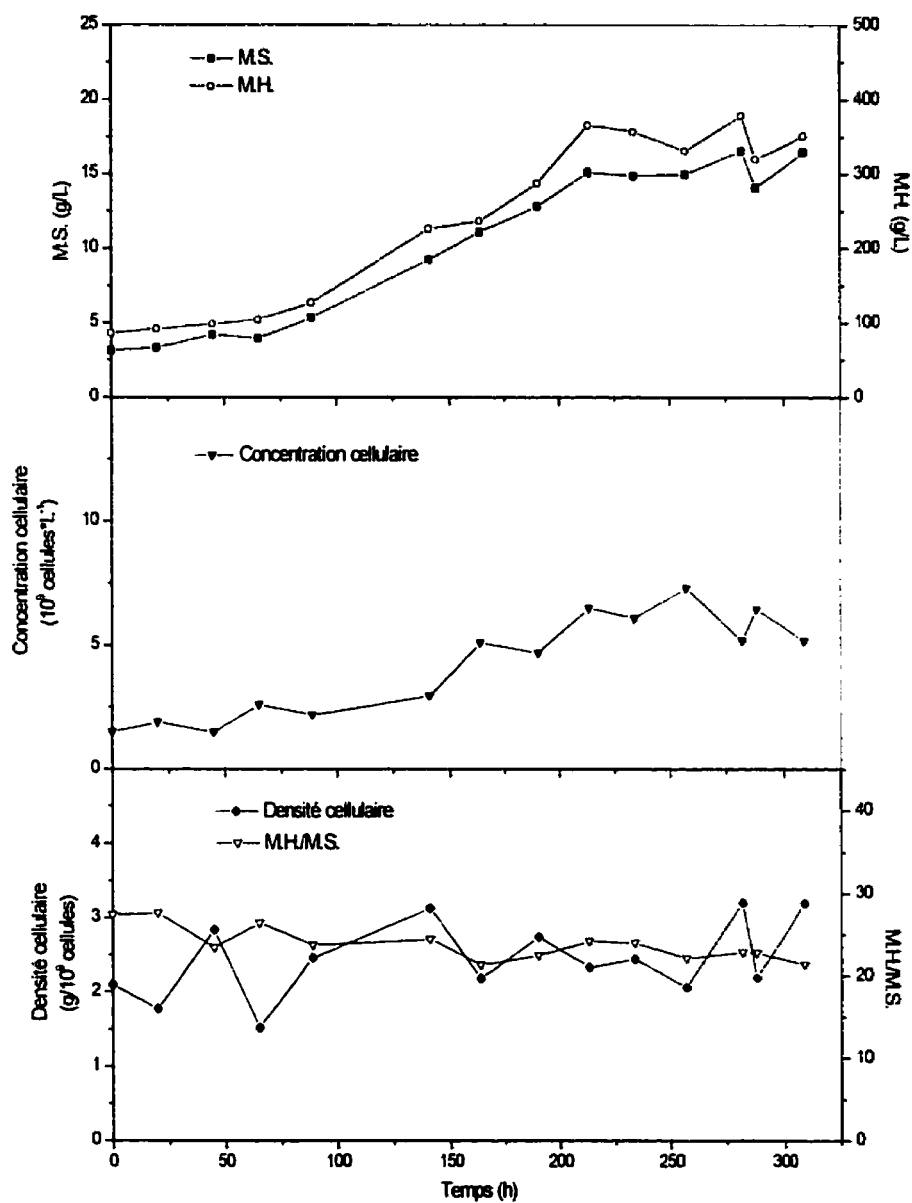


Figure 6.11 - Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et de la densité cellulaire pour la culture R5.

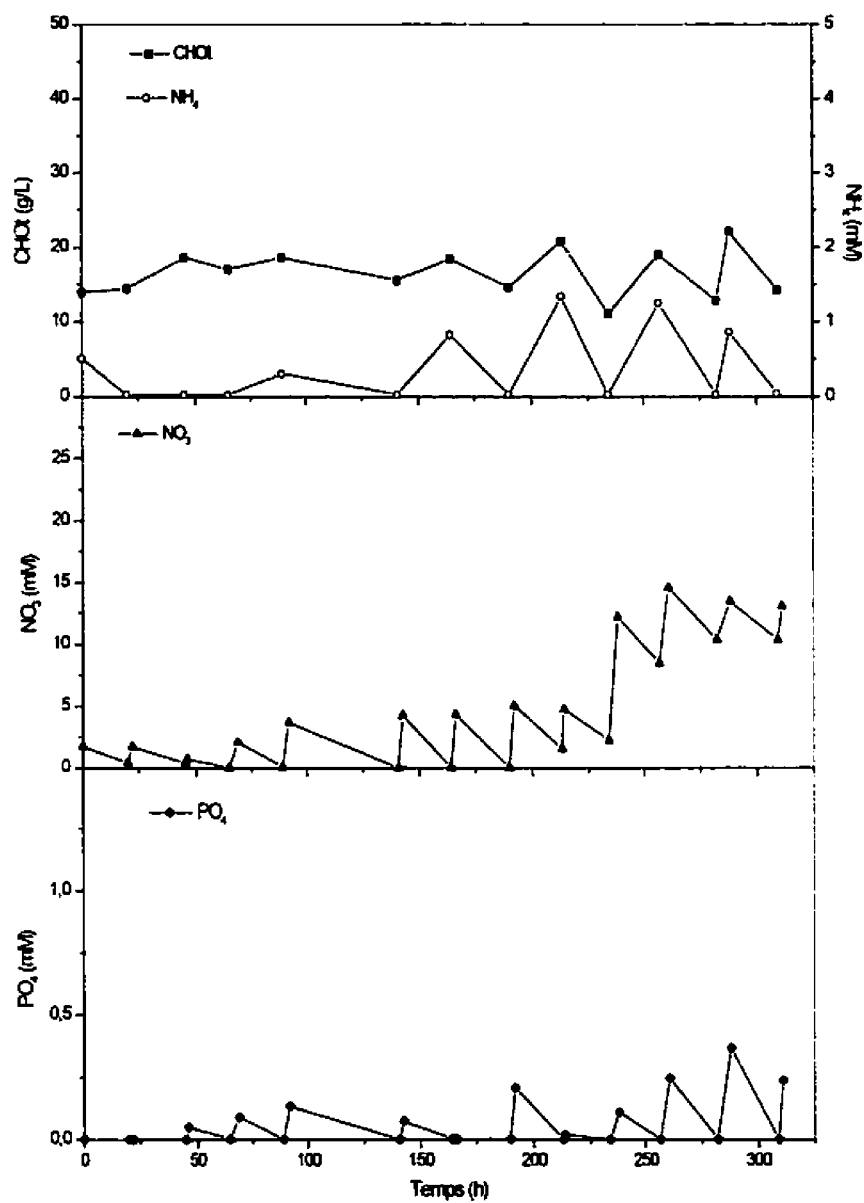


Figure 6.12 - Courbes de consommation des principaux nutriments et évolution du pH pour la culture R5.

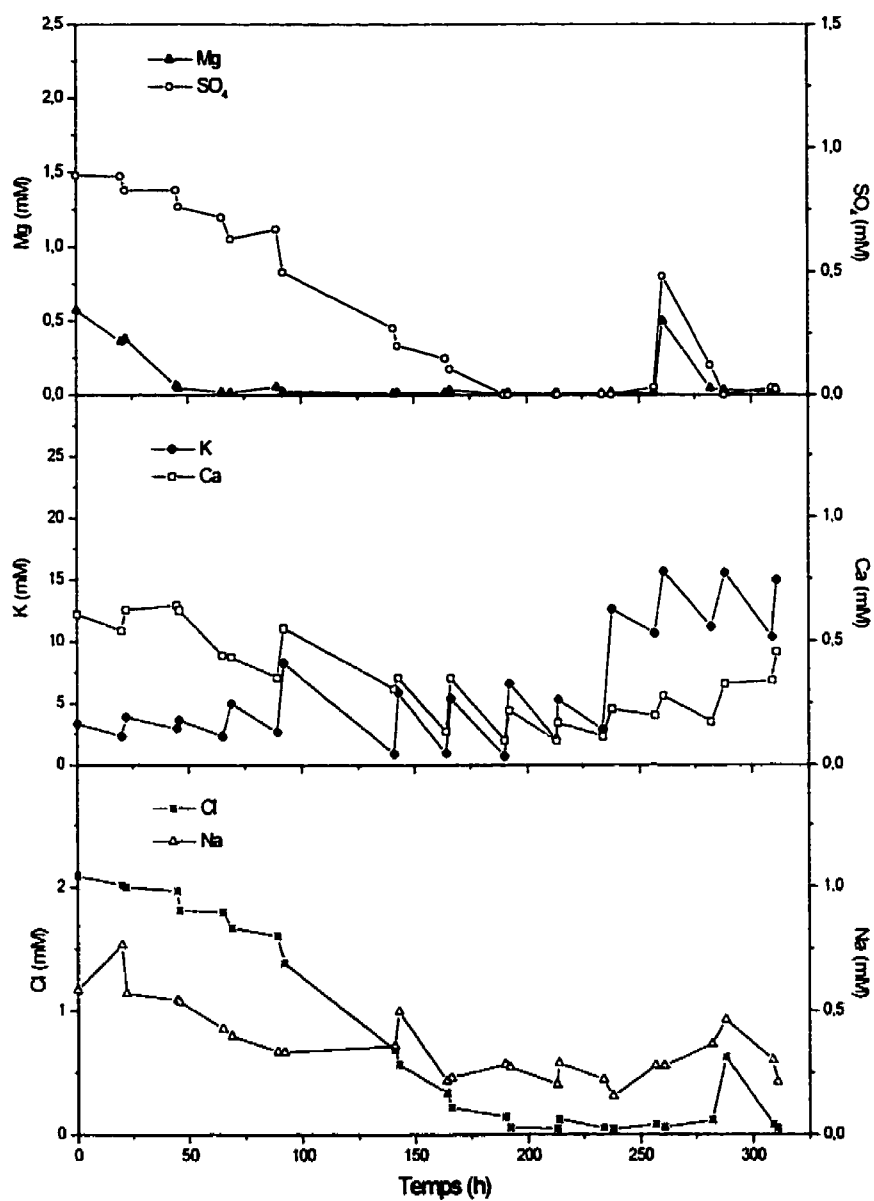


Figure 6.13 - Courbes de consommation des macronutriments secondaires pour la culture R5

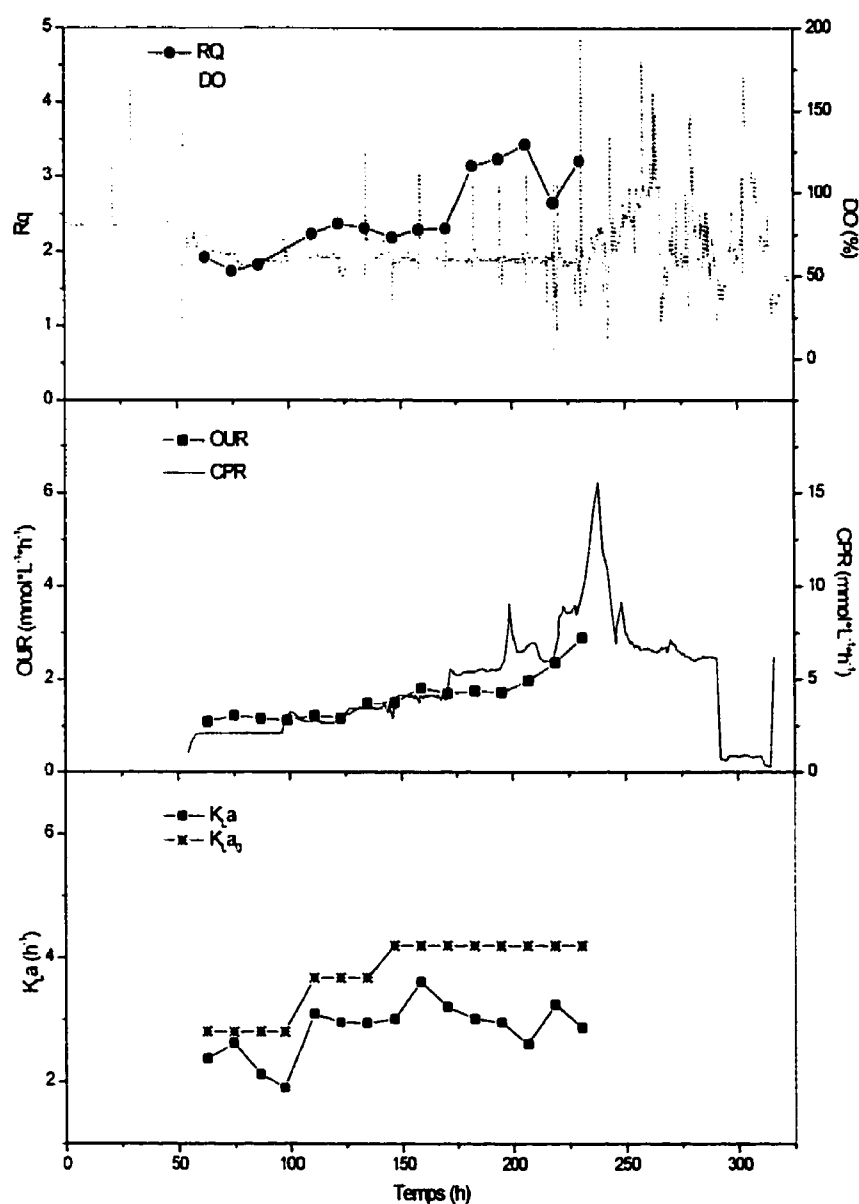


Figure 6.14 – Quotient respiratoire, concentration en oxygène dissous, taux de consommation d'oxygène, taux de production de  $\text{CO}_2$  et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture R5.

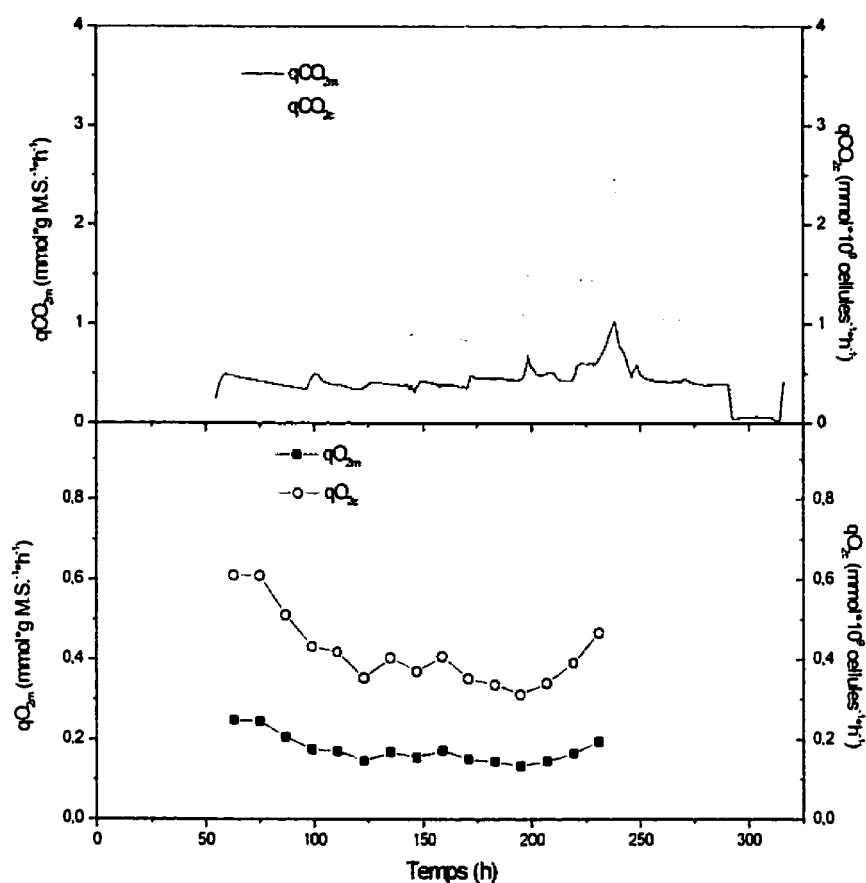


Figure 6.15 - Taux spécifique de consommation d'oxygène et de production de  $\text{CO}_2$  pour la culture R5

#### 6.4. Deuxième stratégie d'alimentation

La culture no. 5 a permis de montrer que plusieurs ions secondaires sont entièrement consommés lors des cultures. Les solutions d'ajouts pour la culture R6 ont donc été préparées dans du milieu B5 sans sel majeur et sans sucre. Les hormones de croissance du milieu B5 ont aussi été ajoutées pour s'assurer que les cellules n'en manquent pas en

cours de culture. Par ailleurs, la concentration minimale visée pour le glucose a été augmentée à  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  plutôt que  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . De plus, les cultures précédentes démontrent que le modèle sous-estime les besoins en azote des cultures. Pour palier à ce problème, la concentration minimale de nitrate visée a été augmentée à 3 mM. Ceci devait fournir une marge d'erreur si le modèle sous-estimait encore la quantité d'azote requise. Les autres paramètres de contrôle du modèle sont demeurés les mêmes.

#### 6.4.1. Profil de croissance

La Figure 6.16 montre le profil de croissance de la biomasse sèche et humide pour la culture R6. Une concentration de  $20,7 \text{ g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$  a été obtenue à partir d'une concentration de  $2,8 \text{ g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cette figure montre aussi le rapport masse humide/masse sèche au cours de la culture. Le rapport est passé de 35 à 25 au cours des 125 premières heures de la culture puis s'est stabilisé. On remarque que le rapport masse humide/masse sèche baisse à la fin de la phase de croissance de la biomasse pour atteindre une valeur de 20. Malgré tout, la concentration en biomasse humide a atteint, encore une fois, une valeur élevée soit  $481 \text{ g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$ . Les ajouts en milieu complet et l'augmentation de la concentration en CHOt ne permettent donc pas de diminuer la taille des cellules. Cette figure montre également la croissance cellulaire en nombre de cellules. La concentration cellulaire a atteint une valeur de  $9,9\cdot 10^9 \text{ cellules}\cdot\text{L}^{-1}$  en 332 heures à partir d'une concentration de  $1,1\cdot 10^9 \text{ cellules}\cdot\text{L}^{-1}$ . La Figure 6.16 montre

également l'évolution de la densité cellulaire. Celle-ci s'est maintenue entre 2,0 et 2,5 tout au long de la culture avec quelques points à l'extérieur de ces valeurs.

Le taux de croissance global pour le nombre de cellules est de  $0,14 \text{ j}^{-1}$  ce qui correspond à un temps de division moyen de 118 heures. Ce taux de croissance est particulièrement lent si on le compare à ceux obtenus dans les cultures précédentes. Le taux de croissance global pour la biomasse est de  $0,13 \text{ j}^{-1}$ .

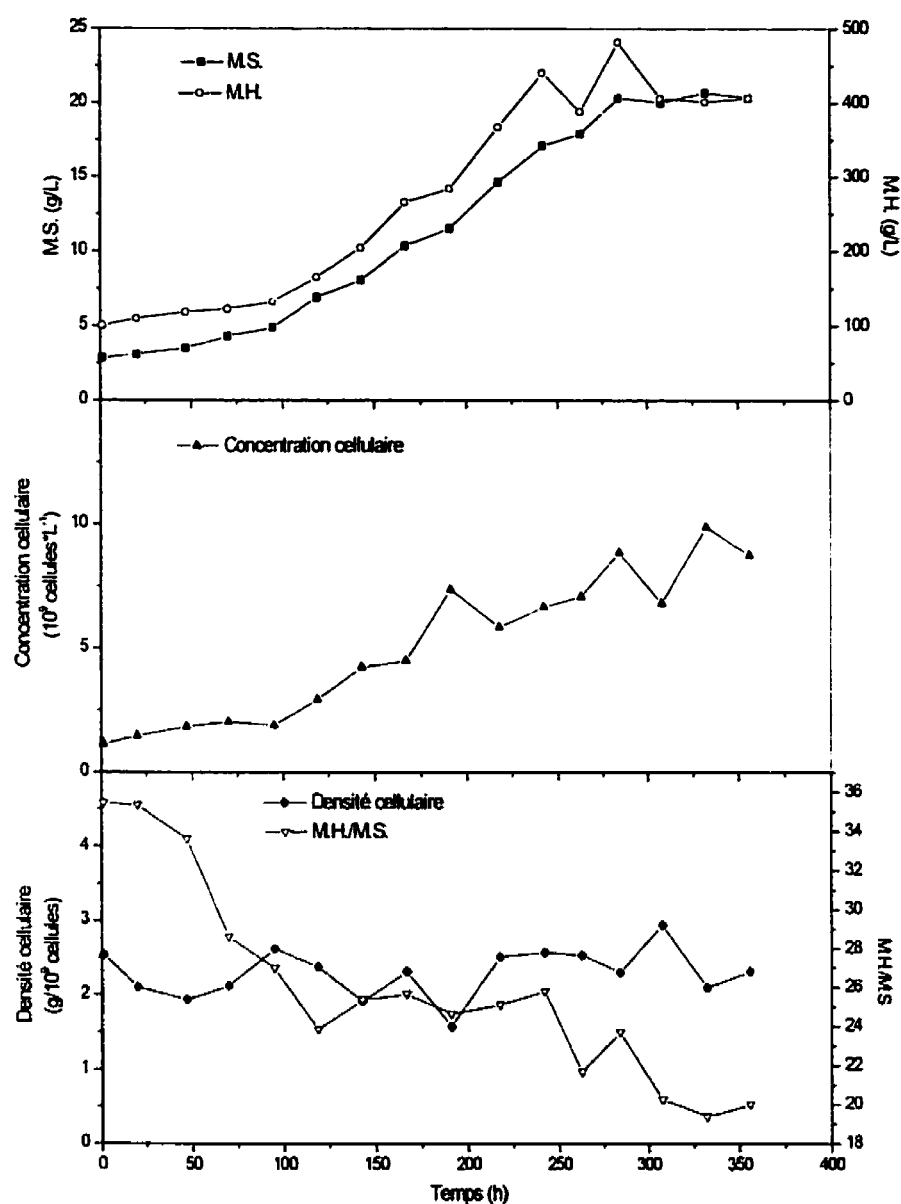


Figure 6.16 – Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et de la densité cellulaire pour la culture R6.



### 6.4.2. Principaux nutriments

L'évolution des principaux nutriments en cours de culture est illustrée à la Figure 6.17.

La concentration en  $\text{CHO}_i$  a été maintenue au dessus de la concentration visée tout au long de la culture sauf en fin de culture où la concentration est tombée à 10 g/L.

L'ammonium, est absorbé très rapidement après chaque ajout comme lors des cultures précédentes. La concentration en nitrate, malgré l'augmentation de la concentration minimale visée, est tombée à zéro plusieurs fois pendant la phase de croissance, ce qui montre clairement, encore une fois, que le modèle sous-estime l'azote nécessaire à la croissance des cellules. Le nitrate s'accumule cependant, après la phase de croissance de croissance de la biomasse. Les ajouts de phosphate sont consommés très rapidement par les cellules comme il a été constaté lors des cultures précédentes.

### 6.4.3. Autres macronutriments

La Figure 6.18 illustre la consommation des macronutriments secondaires. Comme lors des cultures précédentes, le magnésium a été absorbé rapidement. Il est complètement disparu après 100 heures. Le sulfate est également consommé très rapidement au début de la culture. Deux ajouts de  $\text{MgSO}_4$  en cours de culture ont aussi été rapidement consommés. Le chlore est absorbé pendant la culture mais moins rapidement que le magnésium et le sulfate. Il faut 225 heures pour qu'il ait entièrement disparu. La concentration en sodium baisse légèrement en cours de culture. Pour sa part le potassium s'accumule pendant la culture.

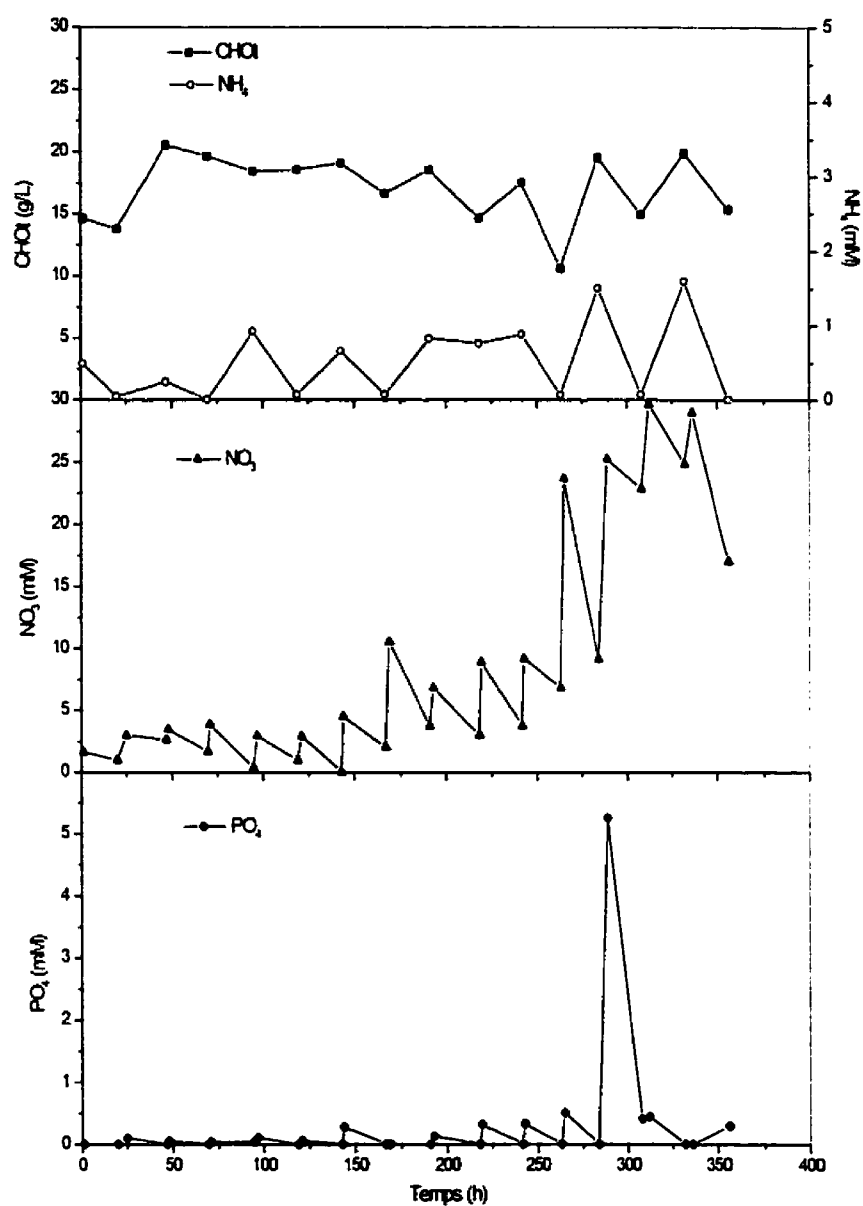


Figure 6.17 – Courbes de consommation des principaux nutriments pour la culture R6.

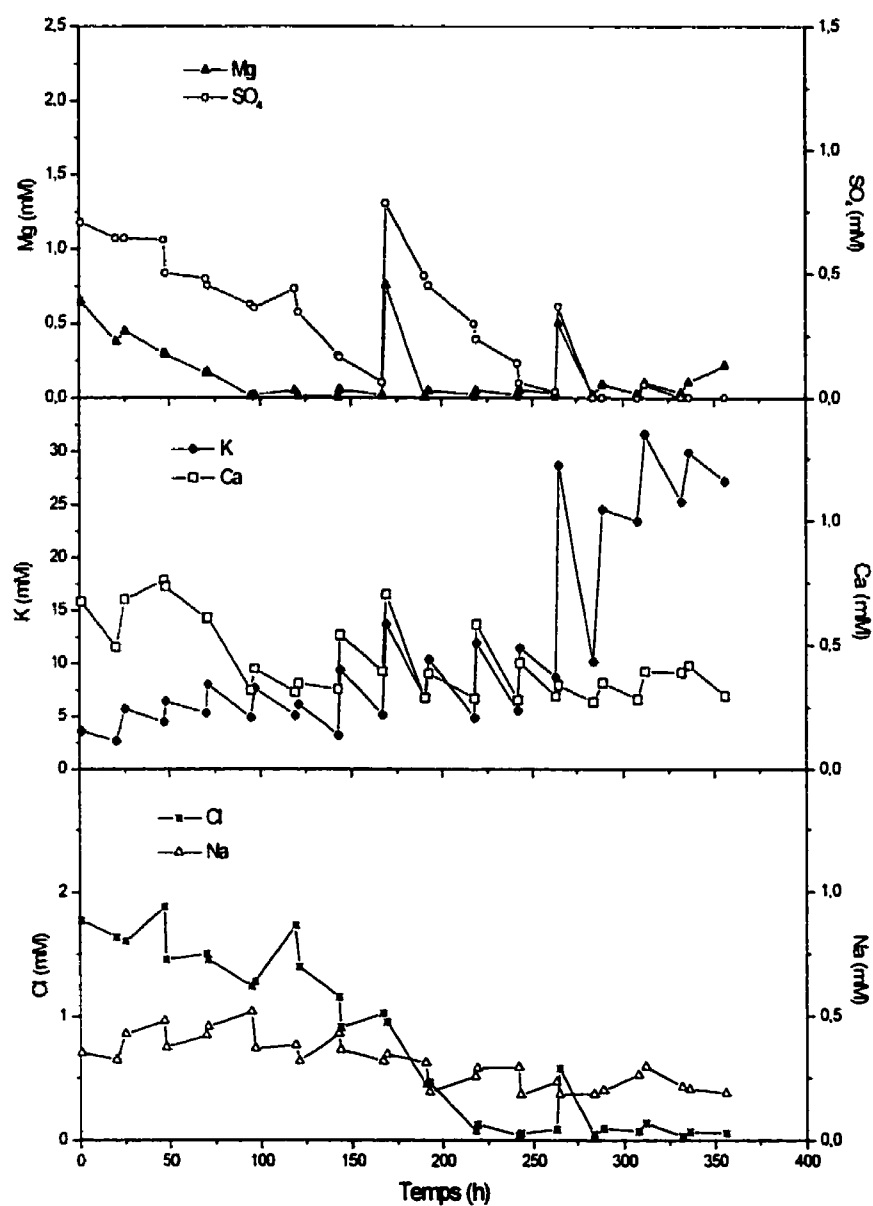


Figure 6.18 – Courbes de consommation des macronutriments secondaires pour la culture R6.

#### 6.4.4. Taux de respiration

L'évolution du OUR, du CPR du Rq et de la DO est présentée à la Figure 6.19. Le OUR augmente graduellement en début de culture pour atteindre  $2,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  après 177 heures. La lecture de la sonde à oxygène dissous étant très instable il n'a pas été possible d'obtenir d'autres mesures du OUR. Le CPR augmente jusqu'à 244 heures atteignant une valeur de  $14,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Par la suite, le CPR chute rapidement, ce qui indique que les cellules, bien qu'elles ne soient pas mortes, ne croissent plus. Le quotient respiratoire, entre 50 et 175 heures de culture, s'est maintenu autour de 3,5.

La Figure 6.20 présente les taux spécifiques de consommation d'oxygène calculés sur la base de la concentration en biomasse et de la concentration cellulaire. Elle présente également les taux spécifiques de production de  $\text{CO}_2$  calculés sur la base de la concentration en biomasse et de la concentration cellulaire. Les taux spécifiques de consommation d'oxygène sont relativement constants jusqu'à 175 heures de culture. Le taux de consommation spécifique d'oxygène de la biomasse est d'environ  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Celui calculé sur la base de la concentration cellulaire demeure autour d'une valeur de  $0,5 \text{ mmol}\cdot 10^9 \text{ cellules}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Le taux de production spécifique de  $\text{CO}_2$  pour la biomasse aussi est relativement constant en cours de culture autour de  $1 \text{ mmol}\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , il diminue cependant légèrement jusqu'à  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  après 250 heures. Le taux de production spécifique du  $\text{CO}_2$  pour la concentration cellulaire décroît également après 250 heures passant de  $1,5 \text{ mmol}\cdot 10^9 \text{ cellules}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  à  $1 \text{ mmol}\cdot 10^9 \text{ cellules}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Ce moment correspond à l'arrêt de la croissance de la biomasse sèche.

### 6.4.5. $K_La$

La Figure 6.19 illustre également l'évolution du  $K_La$  et du  $K_La_0$ . Le  $K_La$  a atteint une valeur de  $2,1 \text{ h}^{-1}$  après 175 heures de culture. Malheureusement, à ce moment, la lecture de la sonde à oxygène dissous est devenue tellement instable qu'il était impossible d'obtenir d'autres valeur d'OUR et de  $K_La$ . Les problèmes de lecture de la sonde correspondent encore une fois avec l'atteinte d'une haute concentration en biomasse humide soit  $300 \text{ g M.H.} \cdot \text{L}^{-1}$ . Il est intéressant de constater que le  $K_La$  est encore une fois beaucoup plus faible que le  $K_La_0$  puisqu'il ne représente que 40% de cette valeur. Ceci illustre, de nouveau, l'effet important de la biomasse sur le transfert d'oxygène.

### 6.4.6. Discussion

Pour éviter la limitation du transfert d'oxygène par la viscosité de la suspension deux mesures ont été prises lors de cette culture. Premièrement, les solutions d'ajouts ont été préparées dans du milieu B5 pour éviter une dilution excessive du milieu de culture et maintenir ainsi une pression osmotique sur les cellules. D'autre part, la concentration minimale en sucre a été augmentée à  $15 \text{ g/L}$  pour maintenir une pression osmotique sur les cellules et les empêcher de se gonfler d'eau. Malheureusement, cette approche n'a pas permis de réduire la concentration en biomasse humide en fin de culture. En effet, le rapport masse humide/ masse sèche est resté autour de 25 pendant toute la culture diminuant à 20 en fin de culture, ce qui est comparable aux valeurs observées dans les cultures précédentes. La densité cellulaire aussi était relativement élevée se maintenant autour de  $2,5 \text{ g}/10^9$  cellules, valeur encore une fois comparable à celles obtenues dans

les cultures précédentes. Résultat, la masse humide a atteint 450 g/L même si la concentration cellulaire n'était pas très élevée. La viscosité élevée de la suspension était d'ailleurs clairement visible dans le bioréacteur.

Les cellules ont encore manqué de nitrate à deux reprises au début de la phase de croissance. L'augmentation de la marge de sécurité sur le point de consigne du nitrate ne semble pas suffisante pour compenser les erreurs du modèle. De plus, la culture a, encore une fois, manqué de  $\text{Mg}^{2+}$  et de  $\text{SO}_4^{2-}$  ainsi que de  $\text{Cl}^-$ . Les deux ajouts effectués ont été faits trop tard, ce qui montre qu'un suivi quotidien des ions dans le milieu est absolument nécessaire pour détecter la baisse de concentration des ions et permettre d'effectuer un ajout avant que la concentration tombe à zéro.

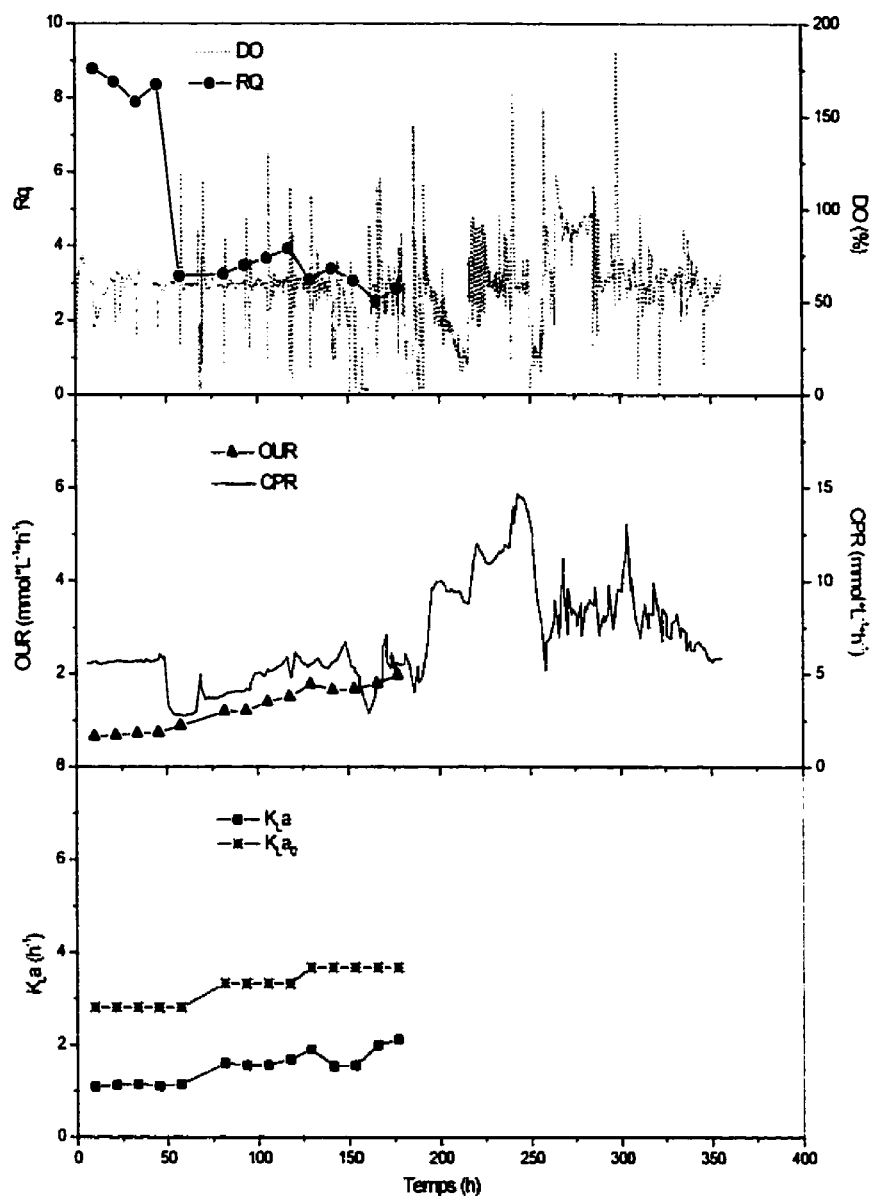


Figure 6.19 – Quotient respiratoire, concentration en oxygène dissous, taux de consommation d'oxygène, taux de production de  $\text{CO}_2$  et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture R6.

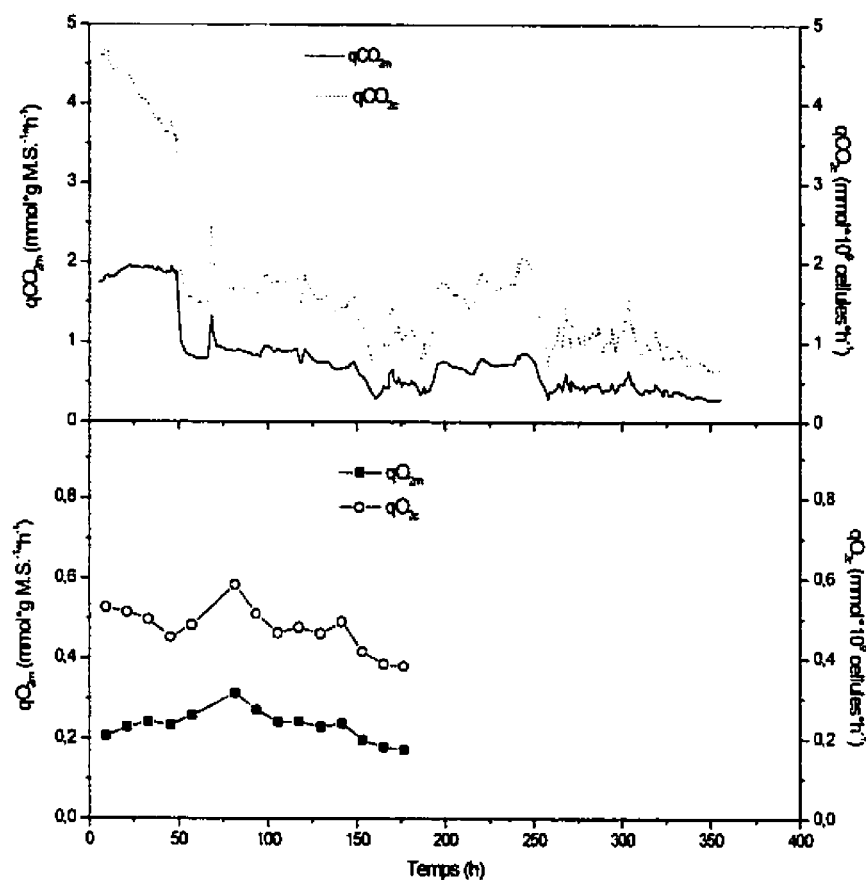


Figure 6.20 – Taux spécifique de consommation d'oxygène et de production de CO<sub>2</sub> pour la culture R6

### 6.5. Troisième stratégie d'alimentation : contrôle de l'ammonium extracellulaire

La culture no. 6 a démontré encore une fois qu'à haute concentration en biomasse le transfert d'oxygène est limité. Les ajouts en milieu complet n'ont pas permis de limiter l'augmentation de la biomasse humide. Il était donc nécessaire de mettre au point une



nouvelle approche. Plutôt que de maintenir une concentration intracellulaire d'ammonium, le point de consigne a été changé pour une concentration extracellulaire de 1 mmol/L. Sachant que la présence d'ammonium favorise la division cellulaire plutôt que l'élargissement des cellules comme le fait le nitrate, cette approche devait permettre l'obtention de petites cellules et donc une diminution de la viscosité de la suspension cellulaire. De plus, les concentrations de  $\text{Mg}^{2+}$  et de  $\text{SO}_4^{2-}$  dans les solutions d'ajouts ont été augmentées pour éviter de nouvelles pénuries de ces ions. Les autres concentrations pour le modèle sont demeurées les mêmes que lors de la culture R6 soit :  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose,  $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de nitrate et  $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de phosphate intracellulaire.

### 6.5.1. Profil de croissance

La Figure 6.21 illustre le profil de croissance de la biomasse sèche et humide. La culture a permis d'obtenir  $20,8 \text{ g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$  à partir d'une concentration initiale de  $2,6 \text{ g M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$ . La Figure 6.21 montre aussi le rapport masse humide/masse sèche pendant la culture. Il est intéressant de constater que ce rapport est passé de 35 à 20 pendant les 150 premières heures de la culture, puis s'est maintenu autour de 20 pour le reste de la culture. Cette valeur est inférieure à celles observées lors des cultures précédentes. La Figure 6.21 montre également le profil de croissance pour le nombre de cellules. La culture a atteint une concentration cellulaire de  $11,2\cdot 10^9 \text{ cellules}\cdot\text{L}^{-1}$  malheureusement, cette concentration a ensuite chuté autour de  $9\cdot 10^9 \text{ cellules}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cette figure illustre aussi l'évolution de la densité cellulaire pendant la culture. Il est

intéressant de voir que la densité cellulaire a d'abord diminué pour se stabiliser autour de  $1,5 \text{ g}/10^9$  cellules au cours de la phase de croissance. Cette valeur est particulièrement basse par rapport aux autres cultures. Les hautes valeurs en fin de culture sont attribuables au fait que la biomasse a continué à augmenter malgré l'arrêt de la division cellulaire, ce qui indique que les cellules encore vivantes grossissent.

Le taux de croissance global pour le nombre de cellules est de  $0,20 \text{ j}^{-1}$ , ce qui correspond à un temps de division de 83 heures. Le taux de croissance global pour la biomasse, pour sa part, est de  $0,14 \text{ j}^{-1}$ , ce qui correspond à un temps de division de 120 heures.

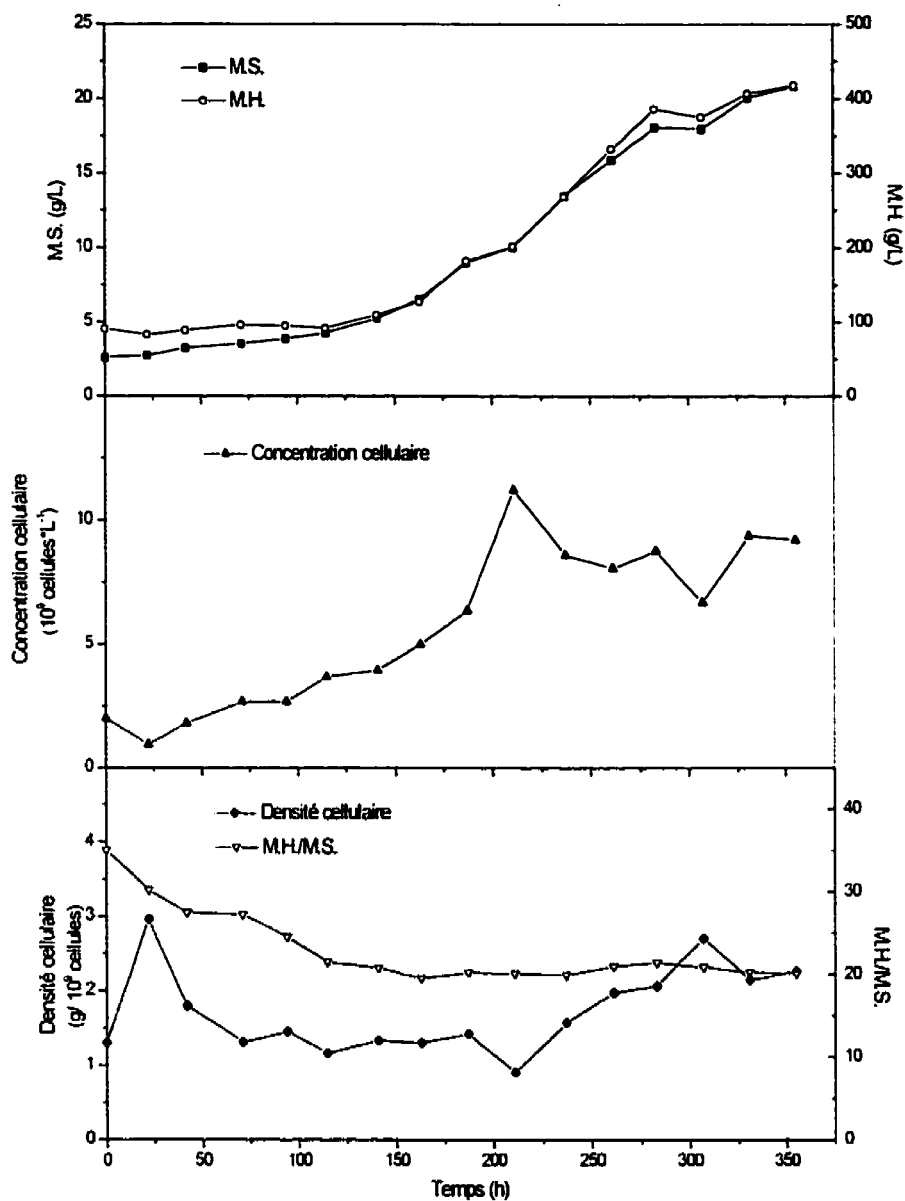


Figure 6.21 - Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et de la densité cellulaire pour la culture R7.

### 6.5.2. Principaux nutriments

La consommation des principaux nutriments pour la culture R7 est illustrée à la Figure 6.22. La concentration en  $\text{CH}_2\text{O}$  a été maintenue au-dessus de la concentration minimale visée qui était de  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La concentration en ammonium a, par contre, été difficile à maintenir au-dessus de  $1 \text{ mM}$ . La concentration en ammonium est effectivement tombée à zéro plusieurs fois pendant la phase de croissance de la biomasse. Il est à remarquer aussi que la croissance en nombre de cellules s'est arrêtée 48 heures après la première chute de la concentration en ammonium à zéro. Par contre, la croissance de la biomasse n'a nullement été affectée par la disparition de l'ammonium du milieu de culture, ce qui veut dire que les cellules se sont mises à grossir plutôt qu'à se diviser. Le nitrate a été peu consommé pendant les 125 premières heures de la culture, suggérant que l'ammonium était pratiquement la seule source d'azote utilisée par les cellules. Par la suite, le nitrate alimenté est consommé par les cellules bien que pour cette culture, la concentration minimale visée pour le nitrate a pu être maintenue. Il est donc certain que les cellules n'ont pas manqué d'azote.

La Figure 6.24 montre les taux de consommation pour les deux sources d'azote. Le taux de consommation d'ammonium augmente rapidement pendant les 50 premières heures pour ensuite se stabiliser. Par contre, le taux de consommation du nitrate augmente rapidement après 125 heures, au moment où la culture a manqué pour la première fois d'ammonium. Il se maintient ensuite à des valeurs élevées jusqu'à la fin de la phase de croissance de la biomasse. Le taux de consommation maximal du nitrate correspond au

moment où la culture a manqué pour la première fois d'ammonium puis se maintient à ce niveau pour le reste de la culture. Il est donc important que la culture ne manque pas d'ammonium pour éviter que les cellules se mettent à consommer le nitrate.

Le phosphate est consommé par les cellules plus rapidement que lors des cultures précédentes. Le phosphate est consommé tellement rapidement qu'il est absorbé avant que les échantillons soient traités, ce qui explique que la concentration en phosphate reste près de zéro tout au long de la culture. Il est donc possible que les besoins en phosphate des cellules aient changé avec le maintien d'une concentration d'ammonium dans le milieu.

### 6.5.3. Autres macronutriments

La Figure 6.23 montre les profils de concentration du magnésium et du sulfate pendant la culture. Il est intéressant de voir que la concentration de ces deux ions se met à diminuer rapidement dans le milieu de culture exactement au moment où le nitrate se met à être consommé. D'ailleurs, le taux de consommation du magnésium, illustré à la Figure 6.24, augmente pendant les 175 premières heures pour retomber par la suite. Il est clair que le taux de consommation maximal du magnésium correspond au moment où la culture a manqué d'ammonium. La disparition de ces ions lors des cultures précédentes peut donc être liée au fait que le nitrate était consommé par les cellules. En effet, il semble que la consommation de magnésium soit liée à la consommation de nitrate. Les cellules lorsqu'elles consomment du nitrate doivent le réduire en  $\text{NH}_4^+$  puisque l'azote

n'est utilisé que sous forme complètement réduite. Pour ce faire, les cellules ont besoin d'ATP. Or, le  $Mg^{2+}$  est impliqué comme cofacteur avec l'enzyme qui catalyse la conversion de l'ADP en ATP (VanDemark et Batzing, 1987). Par conséquent, la consommation de nitrate par les cellules entraîne indirectement une augmentation de la consommation de  $Mg^{2+}$ . Les autres ions ont été peu consommés pendant la culture.

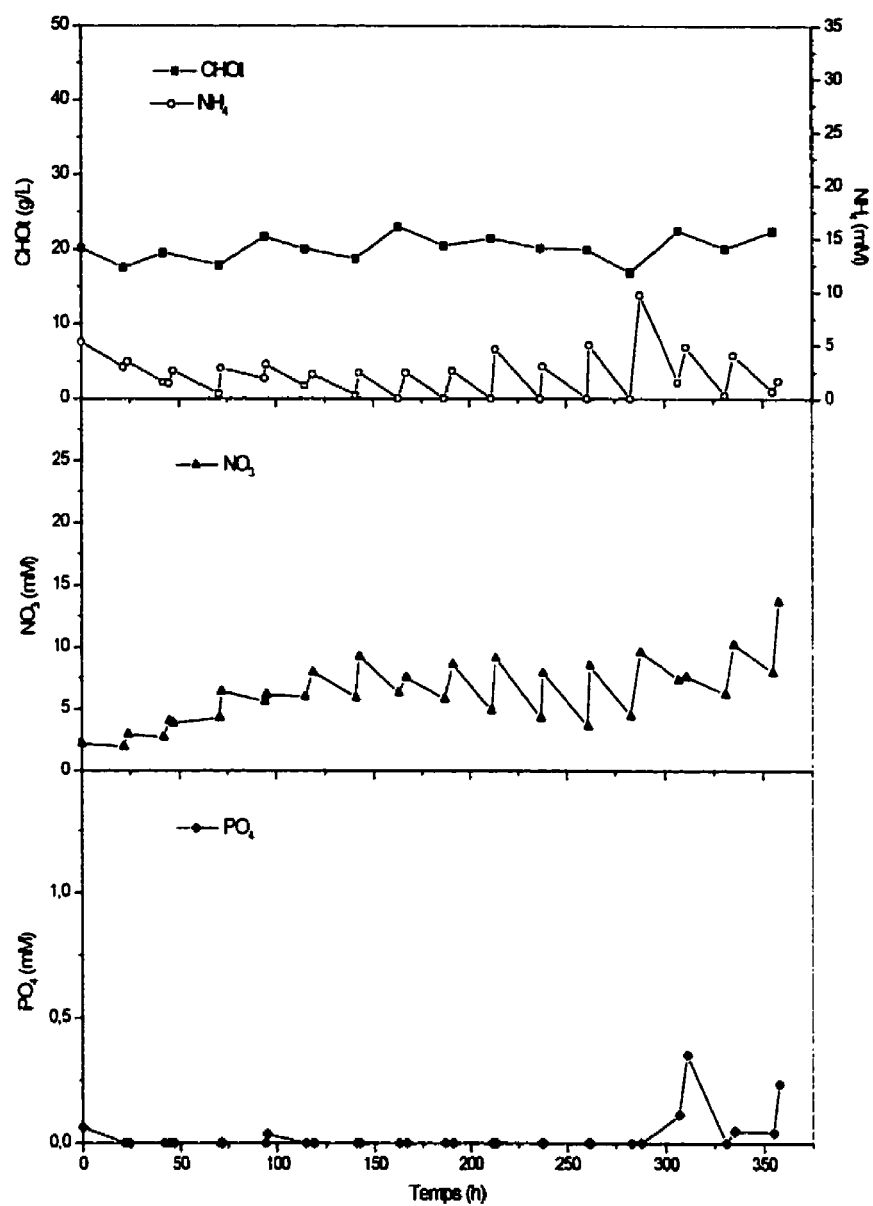


Figure 6.22 - Courbes de consommation des principaux nutriments pour la culture R7.

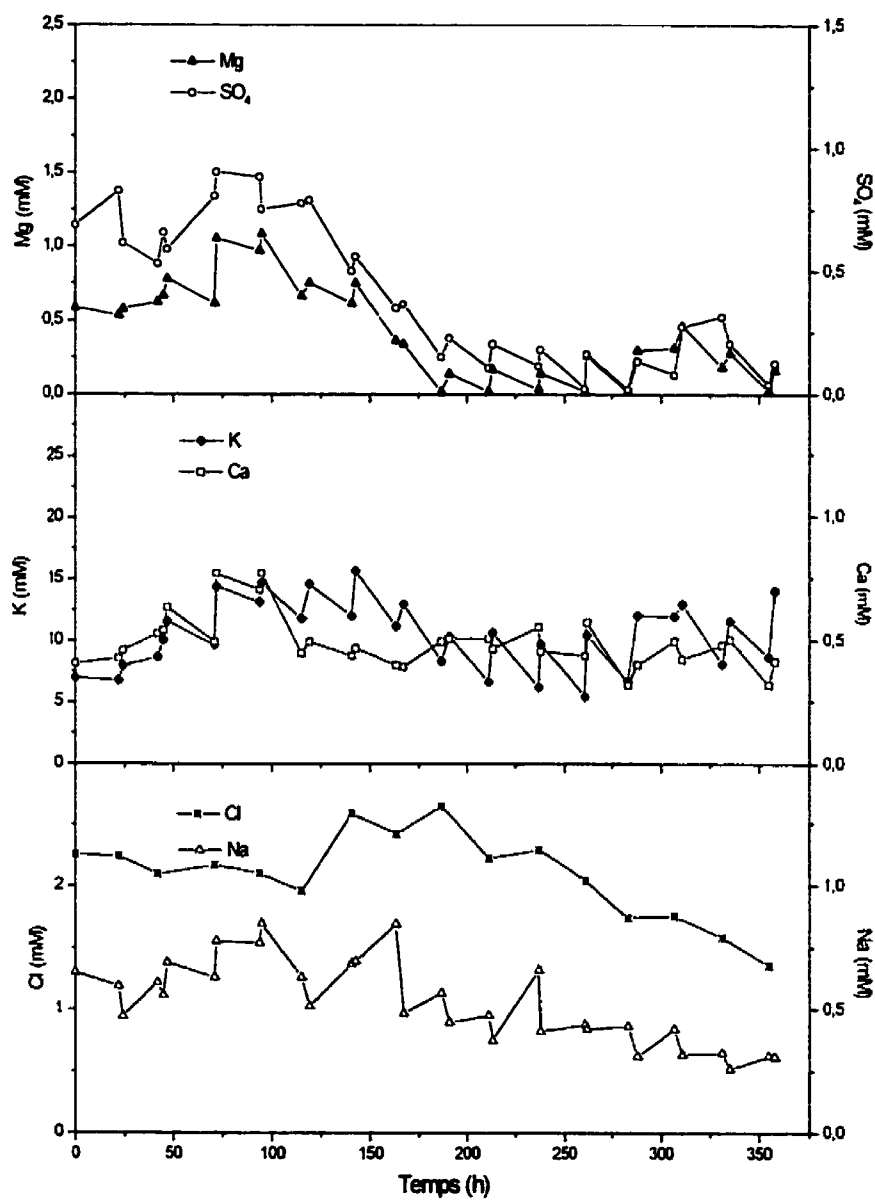


Figure 6.23 - Courbes de consommation des macronutriments secondaires pour la culture R7.



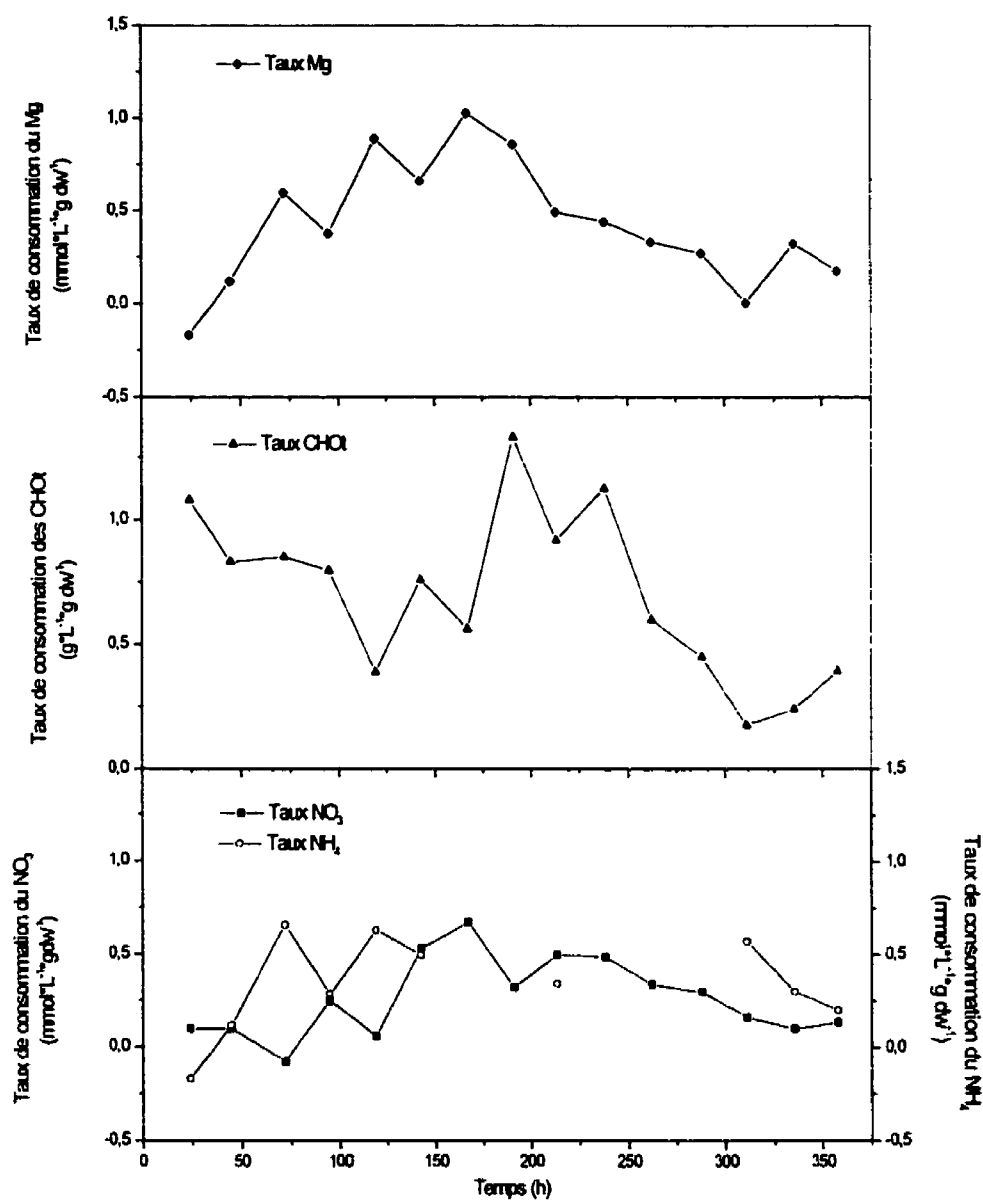


Figure 6.24 – Taux de consommation du magnésium, des glucides, du nitrate et de l'ammonium pour la culture R7.

#### 6.5.4. Taux de respiration

La Figure 6.25 illustre les taux de consommation d'oxygène et de production de  $\text{CO}_2$ . On voit que les deux courbes se suivent et augmentent pendant pratiquement toute la culture. Encore une fois, des problèmes avec la lecture de la sonde à oxygène dissous ont empêché de faire des mesures d'OUR en fin de culture. Le OUR atteint une valeur de  $2,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  après 275 heures de culture et le CPR une valeur de  $9,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  en fin de culture. Le CPR et le OUR continuent d'augmenter jusqu'à l'arrêt de la croissance de la biomasse. Le quotient respiratoire semble, pour sa part, être resté relativement constant autour d'une valeur de 2 pendant les 150 premières heures de la culture pour ensuite augmenter graduellement jusqu'à une valeur d'environ 3 après 275 heures de culture.

La Figure 6.26 montre l'évolution des taux de consommation spécifiques d'oxygène calculés sur la base de la concentration en biomasse et de la concentration cellulaire. Les taux de consommation spécifiques pour l'oxygène sont demeurés très constants tout au long de la culture. Le taux de consommation spécifique pour la biomasse demeure entre  $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  et  $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Le taux de consommation spécifique d'oxygène pour la concentration cellulaire, quant à lui, après les premières 50 heures de culture se stabilise autour de  $0,15 \text{ mmol}\cdot 10^9 \text{ cellules}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Les taux de production de  $\text{CO}_2$  pour la biomasse et la concentration cellulaire sont aussi très constants tout au long de la culture. Le taux de production spécifique pour la biomasse reste à une valeur autour de

$0,5 \text{ mmol} \cdot \text{g M.S.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Le taux de production spécifique pour la concentration cellulaire est d'environ  $0,5 \text{ mmol} \cdot 10^9 \text{ cellules}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

#### 6.5.5. $K_L a$

L'évolution du  $K_L a$  et du  $K_{La0}$  est présentée à la Figure 6.25. Le  $K_L a$  en début de culture est d'environ  $1,7 \text{ h}^{-1}$ . Cette valeur bouge très peu jusqu'à 200 heures de culture, elle augmente ensuite pour atteindre  $3,5 \text{ h}^{-1}$ . De nouveau, le  $K_L a$  demeure toujours beaucoup plus faible que le  $K_{La0}$ , la valeur du  $K_L a$  représentant environ 50% de la valeur du  $K_{La0}$ . La lecture de la sonde à oxygène dissous est encore une fois perturbée par la forte concentration en biomasse après 275 heures de culture, ce qui correspond au moment où la biomasse humide a atteint une valeur de  $350 \text{ g M.H.} \cdot \text{L}^{-1}$ .

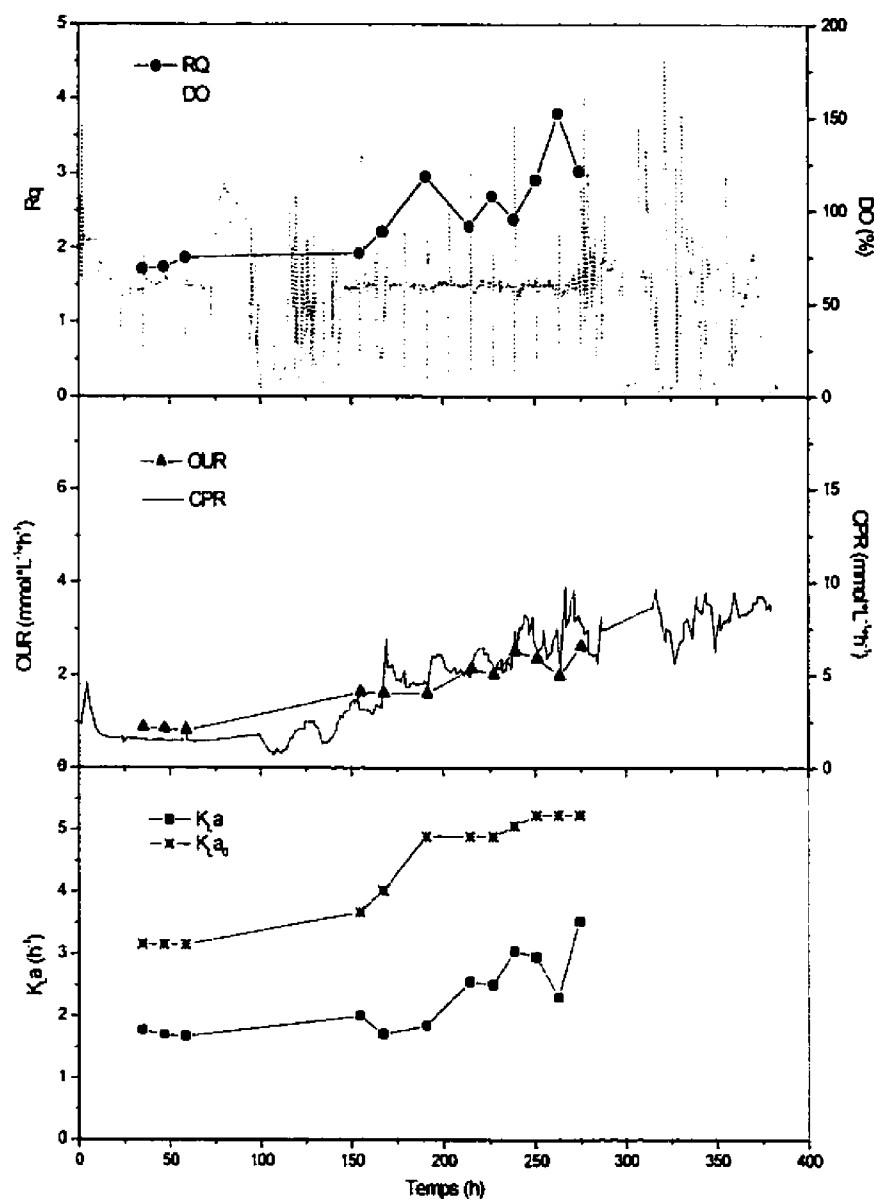


Figure 6.25 – Quotient respiratoire, concentration en oxygène dissous, taux de consommation d'oxygène, taux de production de CO<sub>2</sub> et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture R7.

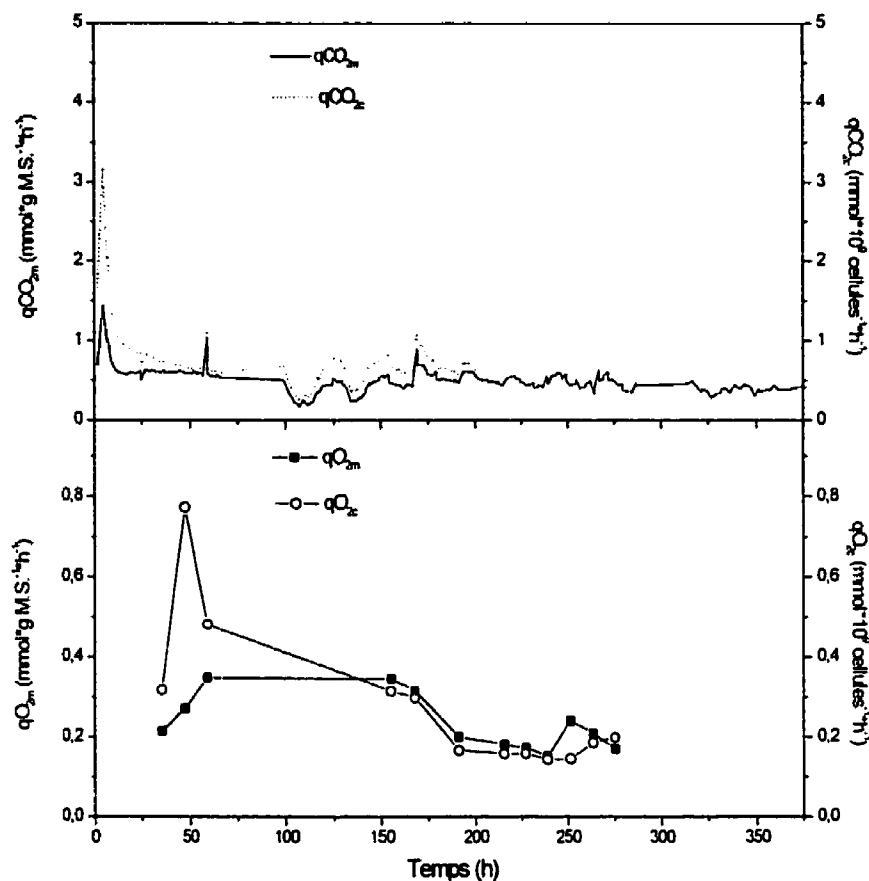


Figure 6.26 - Taux spécifique de consommation d'oxygène et de production de CO<sub>2</sub> pour la culture R7

### 6.5.6. Essais d'élicitation

Les cellules de cette culture ont été récoltées à la fin de l'expérience et cultivées en flacons dans du milieu B5 sans phosphate pour une durée de 3 ou 6 jours. Par la suite, ces cellules ont été cultivées dans du milieu MS sans phosphate et sans hormone et

élicitées avec une suspension de chitine ( $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pendant 7 jours en présence de 2g de résine XAD-7 humide. La biomasse et la résine ont ensuite été récupérées pour l'extraction. Les résultats sont présentés au Tableau 6.2. Les flacons sevrés en phosphate pendant trois jours ont permis d'obtenir un rendement de 3,2 mg de sanguinarine/g de cellules, ce qui est trois fois plus que les flacons témoins qui n'avaient pas été sevrés. Les résultats démontrent donc que le sevrage en phosphate améliore le rendement. Par contre, le rendement n'est pas amélioré par un sevrage de plus de 3 jours. La productivité est aussi maximale après trois jours de sevrage à  $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ , ce qui n'est cependant pas très élevé.

*Tableau 6.2 - Rendement en sanguinarine pour la culture 7*

Temps de sevrage en phosphate (j)	Rendement en sanguinarine (mg/g de biomasse sèche)	Productivité en sanguinarine ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ )
0	$1,1\pm 0,1$	$15\pm 1$
3	$3,2\pm 0,4$	$23\pm 4$
6	$3\pm 1$	$15\pm 5$

*\* Trois flacons pour chaque temps de sevrage. L'erreur est exprimée en écart-type.*

### 6.5.7. Discussion

Le maintien d'une concentration de  $\text{NH}_4^+$  extracellulaire a permis de diminuer le rapport masse humide/masse sèche. En effet, après 160 heures de culture, ce rapport atteint une valeur de 20 et s'y est maintenu jusqu'à la fin de la culture, ce qui montre que les cellules contiennent moins d'eau que lors des cultures précédentes où cette valeur oscillait entre 25 et 35. La densité cellulaire, pour sa part, a rapidement diminuée pendant les 75 premières heures pour se stabiliser entre 1 et  $1,5 \text{ g}/10^9$  cellules. Encore une fois, cette valeur est inférieure à celles observées dans les autres cultures ( $1,5 \text{ g}/10^9$  cellules et  $3 \text{ g}/10^9$  cellules). Malheureusement, on constate qu'après l'arrêt de la division cellulaire (230 heures), la densité cellulaire s'est mise à augmenter. Il semble donc absolument nécessaire de maintenir une concentration extracellulaire de  $\text{NH}_4^+$  pour avoir de petites cellules.

D'autre part, il semble clair qu'on puisse lier la consommation du  $\text{NO}_3^-$  avec la disparition du  $\text{Mg}^{2+}$  et du  $\text{SO}_4^{2-}$  du milieu de culture. Le maintien d'une concentration de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu de culture, en limitant la consommation de nitrate, permettrait donc d'éviter la disparition de ces ions. Il est donc particulièrement intéressant de maintenir dans le milieu une concentration de  $\text{NH}_4^+$ . Cependant, ceci n'est pas aisé puisque le  $\text{NH}_4^+$  est très rapidement consommé par les cellules.

## 6.6. Quatrième stratégie d'alimentation : augmentation du point de consigne en ammonium

La culture R7 a montré que les cellules absorbaient très rapidement l'ammonium du milieu, ce qui rend très difficile le contrôle de la concentration d'ammonium dans le milieu. Or, le maintien de cette concentration est primordial pour s'assurer que les cellules ne soient jamais limitées en ammonium extracellulaire et demeurent en division. La concentration minimale visée est donc augmentée à 3 mM. De plus, pour ajouter une autre marge de sécurité, le taux de consommation spécifique d'ammonium du modèle est doublé ( $0,025 \text{ mmol} \cdot \text{g M.S.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  au lieu de  $0,013 \text{ mmol} \cdot \text{g M.S.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

### 6.6.1. Profil de croissance

La Figure 6.27 montre les profils de croissance de la biomasse sèche et humide. La culture a permis d'obtenir une concentration de  $18,7 \text{ g M.S.} \cdot \text{L}^{-1}$  à partir d'une concentration de  $2,0 \text{ g M.S.} \cdot \text{L}^{-1}$ . La concentration en masse humide est restée particulièrement basse pour cette culture, n'atteignant pas la concentration de  $350 \text{ g M.H.} \cdot \text{L}^{-1}$  qui semble limiter le transfert d'oxygène. Cette figure illustre aussi l'évolution du ratio masse humide/masse sèche pour cette culture. Comme pour les cultures précédentes, ce rapport diminue rapidement au début de la culture pour se stabiliser par la suite, ce qui est remarquable, lors de cette culture, c'est que le rapport se stabilise sous la valeur de 20 atteignant même la valeur de 15. Les cellules auraient donc réduit leur



contenu en eau par rapport aux cultures précédentes. Ceci peut s'expliquer par la présence d'une plus grande quantité d'ions dans le milieu et par la présence d'ammonium qui incite les cellules à demeurer en division et donc plus petites.

La Figure 6.27 présente également la croissance en nombre de cellules. La culture a permis d'obtenir  $20,2 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> à partir d'une concentration de  $0,9 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup>. Malheureusement, comme lors des cultures précédentes, la concentration a ensuite baissé autour de  $15 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup>. La courbe de croissance en nombre de cellules présente deux plateaux très clairs : un après 140 heures de culture et l'autre après 250 heures. Le phénomène est peut-être lié à la taille des cellules. En effet, la Figure 6.27 montre que la division cellulaire arrête chaque fois que la densité cellulaire tombe sous une valeur limite qui semble être de  $1 \text{ g}/10^9$  cellules, ce qui impliquerait que les cellules doivent donc avoir une taille minimale pour se diviser.

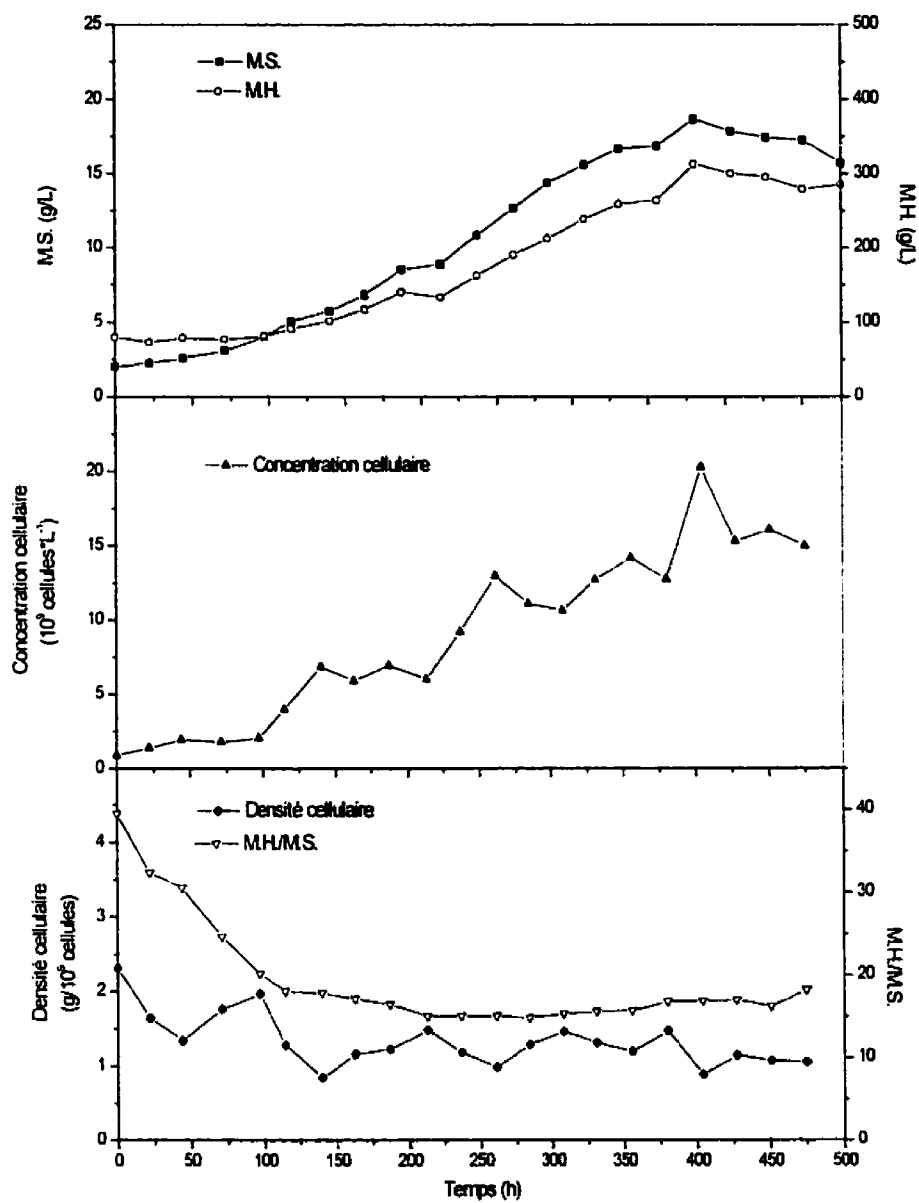


Figure 6.27 - Courbes de croissance, évolution du rapport masse humide/masse sèche et de la densité cellulaire pour la culture R9.

Le taux de croissance global pour le nombre de cellules est de  $0,19 \text{ j}^{-1}$ , ce qui correspond à un temps de division de 89,2 heures. Le taux de croissance global pour la biomasse sèche est de  $0,14 \text{ j}^{-1}$ .

### 6.6.2. Principaux nutriments

La Figure 6.28 montre le profil de concentration des CHOt au cours de la culture. La concentration minimale visée qui était de  $15,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a pu être maintenue à l'exception de quelques points légèrement sous cette valeur. Cette figure présente aussi l'évolution de la concentration en ammonium au cours de la culture. En début de culture, la concentration minimale visée était de 3 mM. Cette concentration a cependant dû être augmentée à 5 mM parce que les cellules absorbaient l'ammonium très rapidement et que la concentration risquait de tomber à zéro. En fin de culture, l'ammonium s'accumule dans le milieu. La Figure 6.30 montre que le taux de consommation de l'ammonium, après s'être maintenu pendant toute la culture, diminue à partir de 350 heures. Cette diminution du taux de consommation de l'ammonium coïncide avec la fin de la croissance de la biomasse. Malgré les ajouts importants d'ammonium, la Figure 6.28 montre que le nitrate a été consommé pendant la culture. La Figure 6.30 montre que le taux de consommation du nitrate augmente en début de culture, puis se stabilise pour enfin diminuer après la fin de la croissance de la biomasse.

Le phosphate a été rapidement consommé pendant toute la culture. Il est à remarquer cependant que celui-ci s'accumule également après la fin de la phase de croissance de la biomasse.

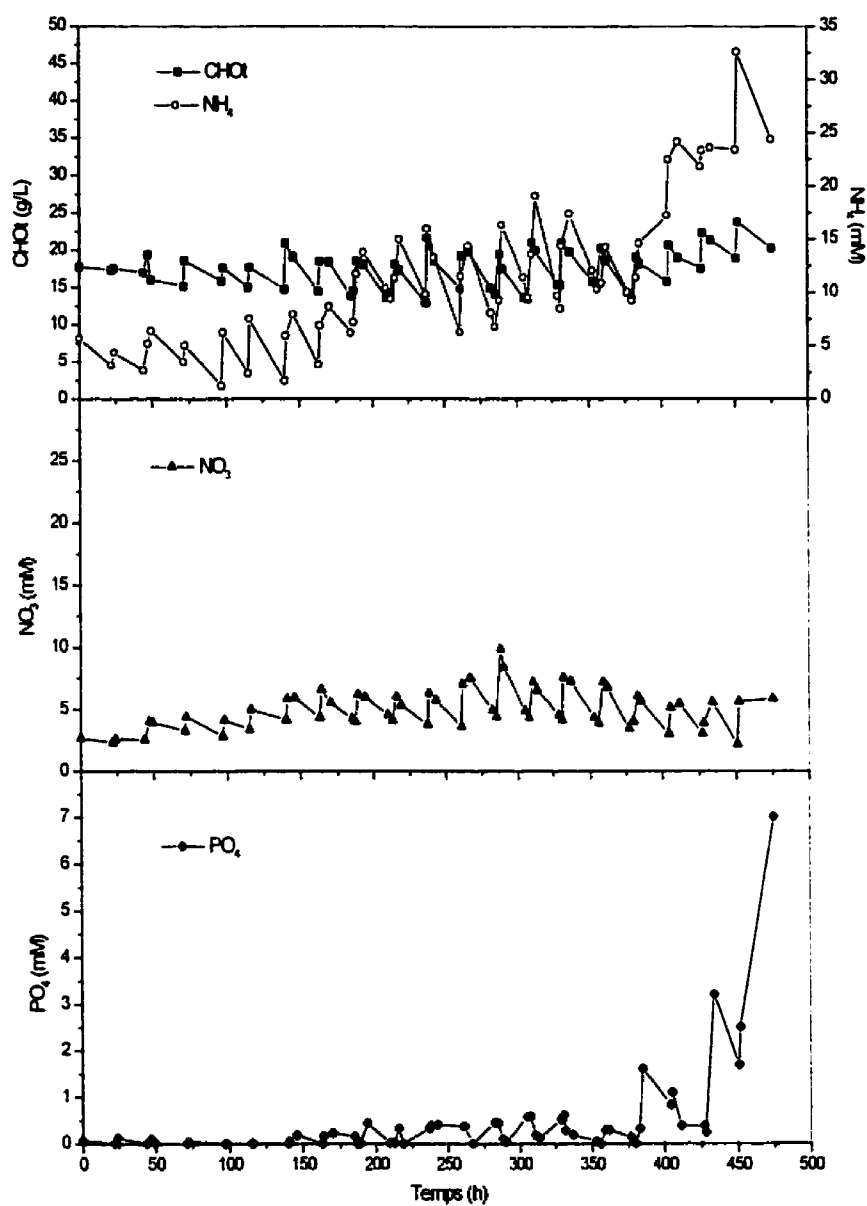


Figure 6.28 - Courbes de consommation des principaux nutriments pour la culture R9.

### 6.6.3. Autres macronutriments

La Figure 6.29 illustre que, contrairement à ce qui a été observé précédemment, le magnésium s'accumule dans le milieu de culture. La Figure 6.30 montre d'ailleurs que le taux de consommation du magnésium s'est maintenu autour de zéro tout au long de la culture. Le sulfate, pour sa part, a été consommé pendant toute la culture mais sa concentration s'est maintenue contrairement à ce qui avait été observé précédemment. Le potassium et le calcium ont tendance à s'accumuler au cours de la culture. Le chlore et le sodium, pour leur part sont demeuré, aux mêmes concentrations. Il est important de remarquer que même si la culture a été très longue, la concentration d'aucun ion n'est tombée à zéro.

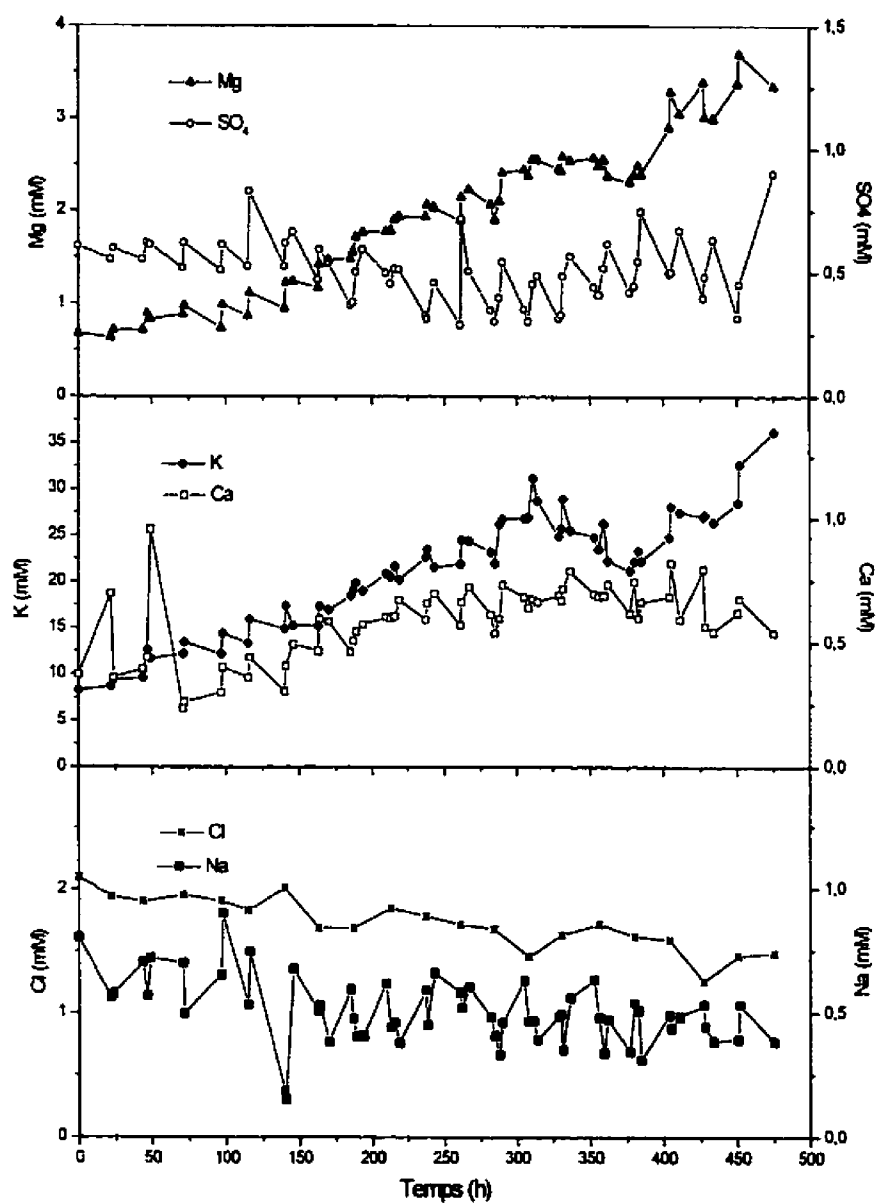


Figure 6.29 - Courbes de consommation des macronutriments secondaires pour la culture R9.

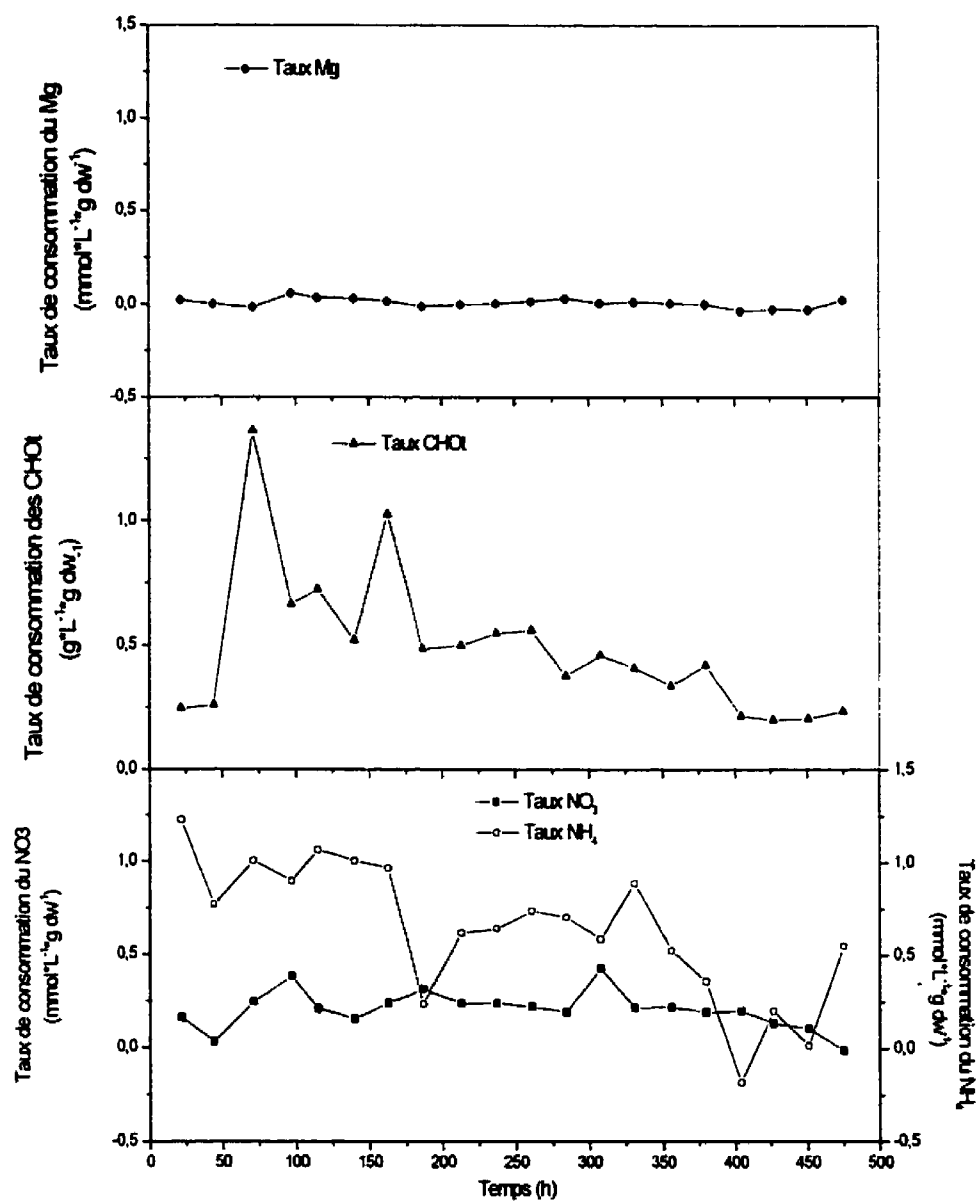


Figure 6.30 - Taux de consommation du magnésium, des glucides, du nitrate et de l'ammonium pour la culture R9.



#### 6.6.4. Taux de respiration

Le taux de consommation de l'oxygène ainsi que le taux de production de  $\text{CO}_2$  sont présentés à la Figure 6.31. Il est à remarquer qu'après 200 heures, il n'a pas été possible d'effectuer des mesures d'OUR parce que la concentration en oxygène dissous devenait difficile à rétablir après chaque mesure et que la lecture de la sonde à oxygène dissous était très instable. Le OUR a atteint une valeur de  $4,1 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  en fin de phase de croissance. Le CPR, pour sa part, a atteint  $10 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  pour ensuite redescendre après la phase de croissance. Le quotient respiratoire s'est maintenu autour de 2,5 pendant la plus grande partie de la phase de croissance.

La Figure 6.32 illustre les taux spécifiques de consommation d'oxygène calculés sur la base de la concentration en biomasse et de la concentration cellulaire. Le taux de consommation d'oxygène pour la biomasse se situait autour de  $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  pour les 175 premières heures. Pour ce qui est du taux de consommation spécifique d'oxygène pour la concentration cellulaire, il variait autour de  $0,4 \text{ mmol}\cdot 10^9 \text{ cellules}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  pour les 175 premières heures de culture. Le taux de production spécifique de  $\text{CO}_2$  pour la biomasse diminue progressivement en cours de culture, passant de  $1 \text{ mmol}\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  à  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{g M.S.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Le taux de consommation spécifique de  $\text{CO}_2$  pour la concentration cellulaire suit le même profil, passant de  $1,5 \text{ mmol}\cdot 10^9 \text{ cellules}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  à  $0,5 \text{ mmol}\cdot 10^9 \text{ cellules}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

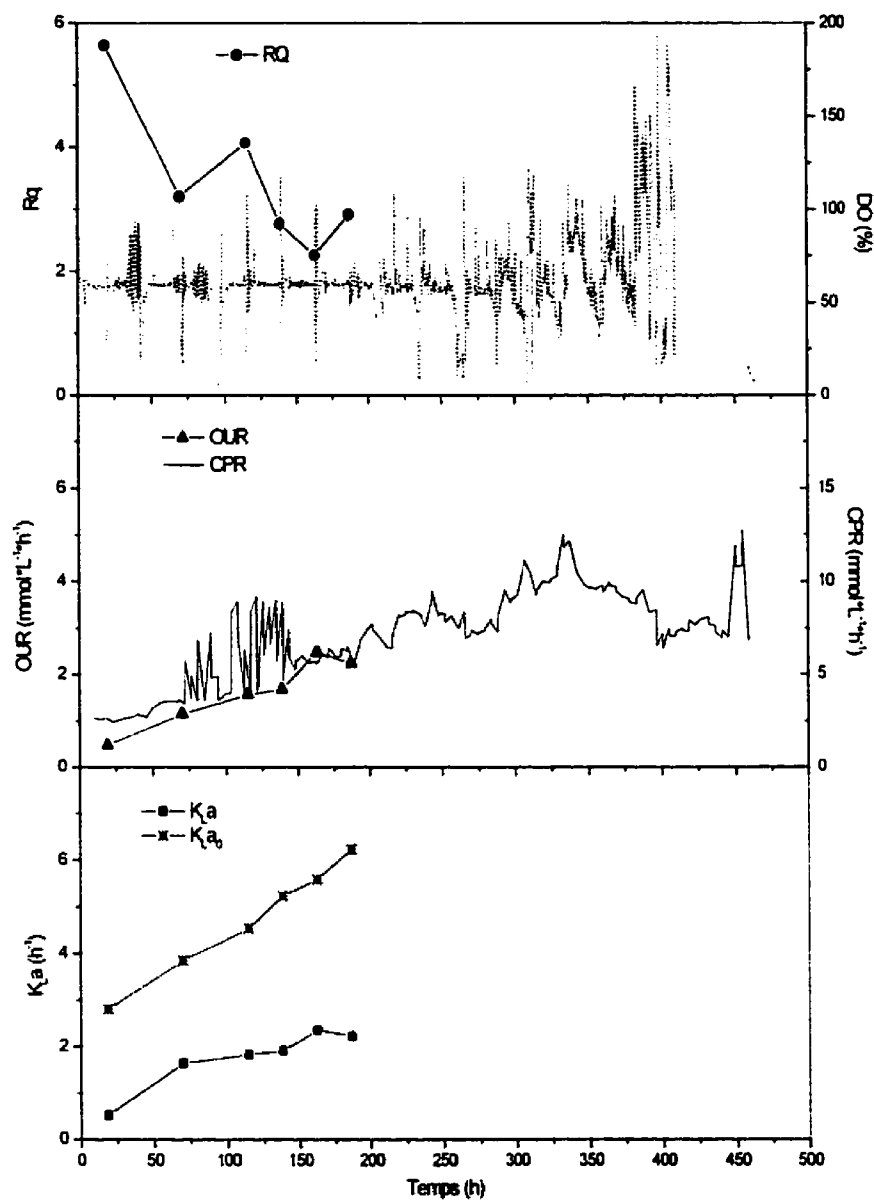


Figure 6.31 – Quotient respiratoire, concentration en oxygène dissous, taux de consommation d'oxygène, taux de production de  $\text{CO}_2$  et coefficient de transfert d'oxygène pour la culture R9.

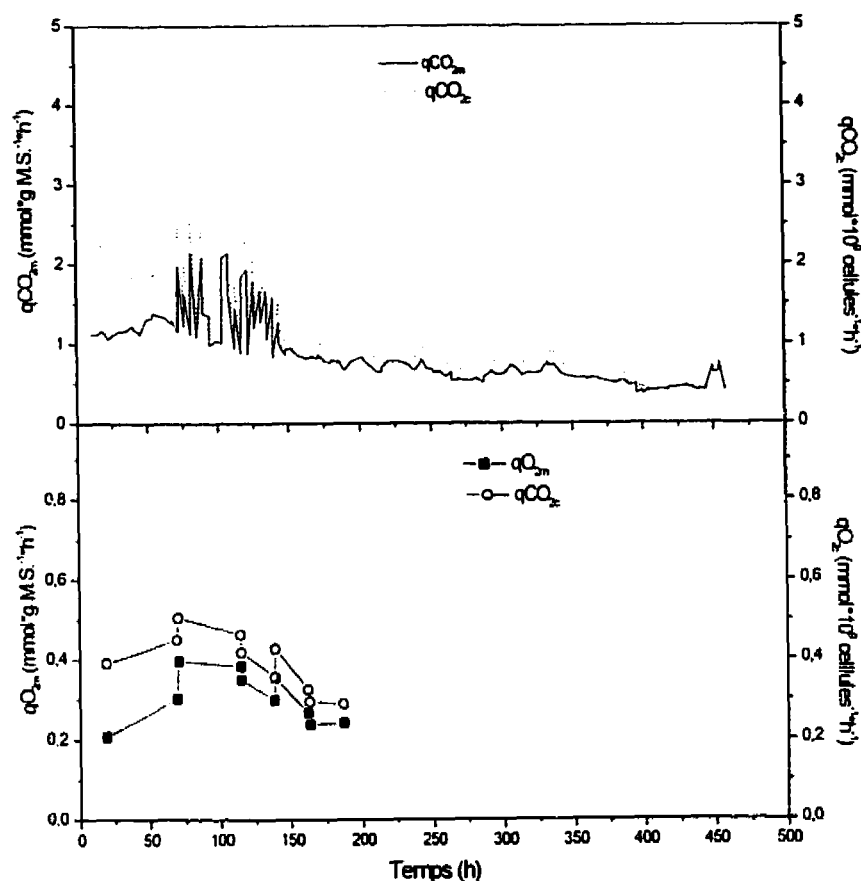


Figure 6.32 - Taux spécifique de consommation d'oxygène et de production de CO<sub>2</sub> pour la culture R9

### 6.6.5. $K_La$

La Figure 6.31 présente l'évolution du  $K_La$  et du  $K_La_0$  pour la culture R9. Encore une fois, il est aisé de constater que le  $K_La$  est beaucoup plus faible que le  $K_La_0$ . En effet, le  $K_La$  représente environ 40% de la valeur du  $K_La_0$ . La lecture de la sonde à oxygène dissous est de nouveau perturbée après 275 heures de culture, à ce moment la biomasse

humide atteint une valeur de 200 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup>. Il semble donc que même si la concentration en biomasse humide a été réduite par une hausse de la concentration en ammonium dans le milieu de culture, cette concentration demeure suffisante pour perturber le fonctionnement de la sonde à oxygène dissous.

#### 6.6.6. Discussion

Le maintien d'une concentration de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans le milieu de culture a permis d'atteindre 20 $\cdot$ 10<sup>9</sup> cellules $\cdot$ L<sup>-1</sup> pour 313 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup> en comparaison des cultures 6 et 7 où on avait obtenu, 9,9 cellules $\cdot$ L<sup>-1</sup> pour 481 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup> et 11,2 cellules $\cdot$ L<sup>-1</sup> pour 418 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup>. Ce résultat est particulièrement encourageant. Il est également à noter que le rapport masse humide/masse sèche, après avoir fortement diminué au cours des 100 premières heures, s'est maintenu en dessous de 20 tout au long de la culture atteignant même 15 par moment. Il faut comparer ce résultat avec les cultures où la concentration en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans le milieu de culture tombait à zéro. En effet, dans ces cultures, le rapport masse humide/masse sèche variait entre 25 et 35. Les cellules étaient donc beaucoup plus gorgées d'eau. La densité cellulaire aussi est très basse, se maintenant sous 1,5 g/10<sup>9</sup> cellules. Le même phénomène s'était produit avec la culture R7. Malheureusement, le manque de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans le milieu avait conduit à une augmentation de la taille des cellules. Le maintien d'une concentration en NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans le milieu permet donc de réduire la viscosité de la suspension cellulaire. Il est cependant à noter qu'à 20 $\cdot$ 10<sup>9</sup> cellules $\cdot$ L<sup>-1</sup>, le système d'alimentation en oxygène atteint son extrême limite.

Il est aussi à remarquer que les cellules n'ont pratiquement pas consommé le  $\text{Mg}^{2+}$  et peu consommé le  $\text{SO}_4^{2-}$ , contrairement aux cultures précédentes, ce qui démontre que la consommation de ces ions est liée à la source d'azote utilisée par les cellules.

Le maintien de la concentration extracellulaire de  $\text{NH}_4^+$  n'est cependant pas facile. En effet, les cellules consomment cet ion très rapidement. Il faut donc en ajouter des quantités importantes pour maintenir la concentration dans le milieu. Il faut prendre garde de ne pas ajouter trop d'ammonium dans le milieu, puisqu'il pourrait alors devenir toxique. Pour ce faire, il est nécessaire d'effectuer plusieurs ajouts par jour. D'autre part, n'ayant pas prévu que les cellules consommeraient autant d'ammonium, la solution d'ajout n'était pas suffisamment concentrée. Par conséquent, les ajouts représentaient un important volume, ce qui a entraîné d'importantes fluctuations dans le volume de culture. La biomasse était donc diluée à chaque ajout, ce qui n'aide certainement pas à obtenir une concentration cellulaire déterminée!

## **6.7. Discussions synthèses**

### **6.7.1. Transfert d'oxygène en culture**

Dès la culture R4, il était évident que le principal facteur limitant le transfert d'oxygène en culture était la haute viscosité des cultures causée par un accroissement de la concentration en biomasse humide. Lorsque la concentration en biomasse atteignait  $300 \text{ g M.H.}\cdot\text{L}^{-1}$ , une augmentation de la viscosité des suspensions était clairement observable

dans le bioréacteur et lors de la prise d'échantillons. En effet, la viscosité de la suspension causait une importante coalescence des bulles à la sortie du diffuseur. Les bulles dans la suspension cellulaire étaient par conséquent beaucoup plus grosses que celles obtenues avec le diffuseur dans l'eau. Il semble donc que le transfert de masse soit fortement affecté par la biomasse présente dans le bioréacteur. D'ailleurs, Jolicoeur et al. rapportent aussi qu'au dessus d'une masse humide de 350 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup> la viscosité apparente et le comportement rhéo-épaississant des cultures est beaucoup plus marqué (Jolicoeur et al., 1992). Les valeurs de  $K_La$  obtenues en culture sont d'ailleurs toujours beaucoup plus faibles que les valeurs obtenues lors des tests dans l'eau. En effet, la valeur du  $K_La$  obtenue dans l'eau pour les diffuseurs centre et intermédiaire combinés était de 4,6 h<sup>-1</sup> pour un débit de 0,02 VVM. Or en culture, pour ce même débit, on obtient un  $KLa$  d'environ 1,8 h<sup>-1</sup>, ce qui représente à peine 40% de la valeur obtenue dans l'eau. Par conséquent, pour obtenir de meilleurs  $KLa$ , il est nécessaire de limiter la croissance de la biomasse et d'éviter une hausse trop importante de la viscosité des cultures.

De plus, il semble qu'au-dessus d'une biomasse de 300 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup>, les lectures de la sonde à oxygène dissous sont très variables. Le phénomène est même apparu à une concentration en biomasse de 200 g M.H. $\cdot$ L<sup>-1</sup>, lors de la culture R9. Ces perturbations de la lecture d'oxygène dissous posent de sérieux problèmes pour le contrôleur d'oxygène dissous.

La première approche explorée, soit l'ajout de mannitol dans le milieu pour augmenter la pression osmotique sur les cellules et limiter leur taille, n'a pas donné les résultats escomptés. La seconde approche qui consistait à préparer les solutions d'ajout dans du milieu B5 pour augmenter l'osmolarité n'a toujours pas permis de réduire la concentration en biomasse humide. Par contre, augmenter la concentration en ammonium pour favoriser la division cellulaire et maintenir la petite taille des cellules a donné des résultats très intéressants. En effet, pour une même biomasse humide limitante, un nombre beaucoup plus élevé de cellules a pu être obtenu.

Néanmoins, à une concentration cellulaire de  $20 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> le transfert d'oxygène était de nouveau limité par la viscosité de la suspension. Une option intéressante pour limiter la coalescence des bulles à la sortie du diffuseur pourrait être de modifier le système d'alimentation des gaz pour permettre une alimentation pulsée.

### 6.7.2. Modèle et cultures

Le modèle développé par Sirois devait permettre de prévoir la croissance de la biomasse sèche ainsi que les ajouts nécessaires pour maximiser la concentration cellulaire. Les concentrations en biomasse mesurés et celles prévues par le modèle sont présentées à la Figure 6.33. La croissance en biomasse prévue par le modèle sous-estimait largement la biomasse pendant une bonne partie de la culture R2. Ceci peut être expliqué par le fait suivant : à cause de concentrations en ammonium plus élevées que celle prévues par le modèle, la croissance cellulaire a été limitée. Or, le modèle est conçu pour prévoir une

croissance exponentielle. Le modèle effectue des prévisions plus justes pour les cultures R4, R5 et R6 mais il éprouve des difficultés pour prévoir l'arrêt de la croissance. Enfin, pour les cultures R7 et R9, où une concentration extracellulaire en ammonium a été maintenue, le modèle prévoit une croissance de la biomasse inférieure à celle mesurée. On peut s'attendre à ce que les prévisions du modèle soient moins solides parce que les taux de consommation ainsi que les taux de croissance utilisés pour les prévisions ne sont plus adéquats puisqu'ils ont été évalués dans des conditions de croissance différentes.

Au cours des premières cultures (R2, R4, R5 et R6), on a pu constater que le modèle sous-estimait la quantité de nitrate à alimenter aux cultures puisque la concentration tombait souvent à zéro alors qu'elle aurait dû être maintenue à 1 mM en tout temps. Par contre, une fois qu'une concentration extracellulaire d'ammonium a été maintenue dans le milieu la concentration en nitrate a pu être contrôlée plus facilement. Le modèle estimait correctement les ajouts de sucre pour maintenir le point de consigne. Pour ce qui est des ajouts de phosphate et d'ammonium, il est difficile de savoir si le modèle estimait correctement les ajouts puisque les points de consignes étaient intracellulaires.



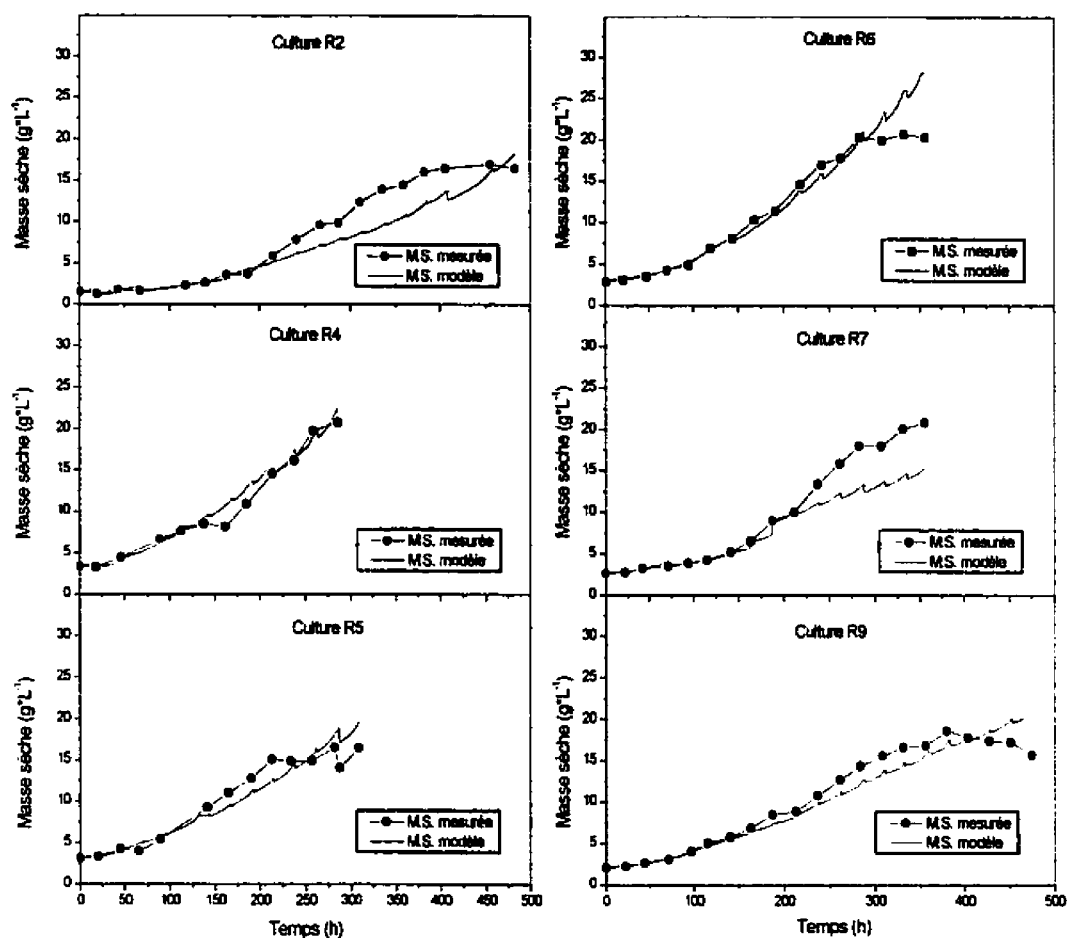


Figure 6.33 – Comparaison des courbes de croissance en biomasse sèche mesurées et générées par le modèle pour les principales cultures

### 6.7.3. Effets du maintien d'une concentration extracellulaire d'ammonium

Pépin et Aubry avaient observé qu'un ajout de  $\text{NH}_4^+$  pouvait relancer la division cellulaire. Les résultats obtenus dans ce travail indiquent que le maintien d'une concentration de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu permet de garder les cellules en division active. De

plus, les cellules sont plus petites lorsqu'une concentration de  $\text{NH}_4^+$  extracellulaire est présente dans le milieu. Le maintien d'une concentration en  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu modifie donc le métabolisme des cellules pour favoriser la division cellulaire et empêcher les cellules de grossir.

De nombreux auteurs signalent que la croissance est limitée par des concentrations trop élevées d'ammonium. Ceci peut-être lié au fait que la consommation de l'ammonium par les cellules cause une acidification du milieu de culture. L'utilisation de citrate d'ammonium plutôt que  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  comme source d'ammonium dans le milieu semble avoir résolu ce problème puisque le citrate sert de tampon dans le milieu de culture.

Lors des cultures effectuées en maintenant une concentration de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu, on constate que malgré une préférence pour le  $\text{NH}_4^+$ , les cellules consomment tout de même du  $\text{NO}_3^-$ . Ceci peut être expliqué par le fait que certaines pompes à nitrate sont exprimées constitutivement (Crawford et Glass, 1998).

La présence de  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu de culture semble aussi avoir un effet sur la consommation de phosphate des cellules. En effet, lors de la culture R9 la division cellulaire s'est arrêtée à trois reprises. Ces arrêts correspondent aux moments où la densité cellulaire était inférieure à  $1 \text{ g}/10^9$  cellules. À chaque arrêt, la division cellulaire a pu être relancée par un ajout de phosphate supplémentaire. Il semble donc que le maintien d'une concentration extracellulaire en  $\text{NH}_4^+$  puisse causer une limitation en

$\text{PO}_4^{3-}$ . Aubry avait également constaté qu'un ajout de phosphate simultanément à l'ajout d'ammonium était nécessaire pour relancer la division (Aubry, 1995).

Les résultats obtenus lors des deux dernières cultures illustrent clairement que les nutriments fournis aux cellules peuvent avoir un effet important sur la division cellulaire et la croissance de la biomasse. Cette approche peut permettre de forcer le métabolisme des cellules de manière à obtenir de hautes concentrations cellulaires tout en minimisant la croissance de la biomasse. Il s'agit donc d'une voie particulièrement intéressante pour le développement de procédés de cultures de cellules végétales à haute densité.

## 7. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

L'objectif principal de ce projet de recherche était l'obtention de cultures à haute densité cellulaire, soit  $20 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup>. Pour ce faire, dans un premier temps, le transfert d'oxygène dans le bioréacteur devait être amélioré pour permettre le maintien de cultures à haute densité. L'obtention d'un  $K_{La}$  de 10 h<sup>-1</sup> pour un débit gazeux de 0,04 VVM et une vitesse d'agitation de 60 rpm était désirée. Par la suite, la stratégie d'alimentation développée par Sirois devait être appliquée pour obtenir des cultures à haute densité. Une concentration de  $20 \cdot 10^9$  cellules/L avait été retenue comme critère puisque c'est la concentration la plus élevée obtenue par Sirois.

### 7.1. Transfert d'oxygène

Dans le but d'améliorer le transfert d'oxygène, plusieurs modifications ont été apportées au bioréacteur. Pour commencer, l'ancien diffuseur a été remplacé par un nouveau permettant d'obtenir des bulles plus fines. Par la suite, plusieurs positions du diffuseur ont été testées (côté, centre et intermédiaire). L'influence du sens de rotation de l'agitateur a également été étudiée. Enfin, deux combinaisons de diffuseurs ont été testées pour déterminer l'effet d'une augmentation de la surface des diffuseurs.

La meilleure position pour installer un diffuseur est la position intermédiaire qui permet d'obtenir un  $K_{La}$  de  $6.0 \pm 0,2$  h<sup>-1</sup> à un débit de 0,04 VVM et une vitesse de 60 rpm en sens anti-horaire. L'arrangement de diffuseurs retenu pour les cultures est la

combinaison du diffuseur central et du diffuseur intermédiaire qui permet d'obtenir un  $K_{La}$  de  $8,0 \pm 0,2 \text{ h}^{-1}$  à un débit de 0,04 VVM et une vitesse de 60 rpm en sens anti-horaire. Pour la même combinaison un  $K_{La}$  de  $4,6 \text{ h}^{-1}$  a été obtenu pour un débit de 0,02 VVM et une vitesse d'agitation de 60 rpm. Dans un bioréacteur similaire utilisant un diffuseur placé au centre et pour les mêmes conditions d'opération Sirois (1997) rapporte un  $K_{La}$  de  $3,5 \text{ h}^{-1}$ . Pour un débit de 0,02 VVM et une vitesse d'agitation de 90 rpm, Sirois rapporte un  $K_{La}$  de  $5,0 \text{ h}^{-1}$  et Aubry (1995) un  $K_{La}$  de  $5,9 \text{ h}^{-1}$  alors que la combinaison du diffuseur central et du diffuseur intermédiaire donne un  $K_{La}$  de  $8,4 \text{ h}^{-1}$ .

Le  $K_{La}$  de  $10 \text{ h}^{-1}$  n'a pas pu être atteint dans ces conditions. D'autres modifications pourraient être apportées au bioréacteur pour améliorer le transfert d'oxygène. Dans un premier temps, la surface des diffuseurs pourrait être augmentée. Il serait également intéressant d'utiliser en parallèle plusieurs diffuseurs placés en position intermédiaire. Ces modifications ne peuvent cependant pas être effectuées sur le bioréacteur existant.

## 7.2. Cultures

Les cultures ont permis d'établir que la principale limitation au transfert d'oxygène en culture était les hautes concentrations en biomasse qui causaient une importante coalescence des bulles. Le faible transfert d'oxygène limitait la prolifération cellulaire et empêchait d'atteindre l'objectif de  $20 \cdot 10^9 \text{ cellules} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Dans un premier temps, l'osmolarité du milieu de culture a été augmentée en y ajoutant du mannitol pour tenter de limiter la taille des cellules en diminuant leur contenu en eau (culture R5). L'ajout de mannitol n'a pas permis de limiter la croissance de la biomasse humide. Par la suite, les ajouts de nutriments ont été préparés dans du milieu B5 pour augmenter la pression osmotique sur les cellules. Cette approche n'a pas permis de limiter la croissance de la biomasse humide.

Une nouvelle approche consistant à maintenir une concentration d'ammonium extracellulaire minimale dans le milieu de culture a donné des résultats beaucoup plus intéressants. Avec cette nouvelle approche une concentration de  $20 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup> a pu être obtenue (culture R9). Il semble, en effet que, le maintien d'une concentration d'ammonium extracellulaire favorise la division cellulaire tout en limitant la taille des cellules. Des études plus approfondies sur le métabolisme semblent nécessaires pour une meilleure compréhension de l'influence des nutriments sur la croissance cellulaire.

Malgré la limitation de la taille des cellules obtenue avec le maintien d'une concentration en ammonium dans le milieu, la viscosité de la suspension demeure très élevée à une concentration de  $20 \cdot 10^9$  cellules·L<sup>-1</sup>. Par conséquent, le transfert d'oxygène se trouve encore une fois limité. Une solution à envisager pour éviter la coalescence des bulles, due à la viscosité, serait de pulser les gaz alimentés au bioréacteur. En effet, la coalescence se produit vraisemblablement à la sortie du diffuseur à cause de la résistance élevée de la phase liquide. L'alimentation pulsée permettrait de limiter la taille des bulles et d'améliorer le transfert d'oxygène.

D'autre part, la culture en cuvée alimentée avec des ajouts ponctuels ne semble pas être le système le plus approprié pour l'obtention de cultures à haute densité cellulaire. En effet, les besoins en nutriments des cellules conduisent à des ajouts importants, en particulier, dans le cas du glucose et pour le maintien d'une concentration en  $\text{NH}_4^+$  dans le milieu puisque ce nutriment est consommé très rapidement. Les ajouts constants causent une dilution de la biomasse et donc retardent l'atteinte d'une haute concentration. Il serait donc nécessaire d'obtenir des solutions d'ajout très concentrées pour limiter les fluctuations du volume de culture. De plus, dans le cas de l'ammonium, pour maintenir une concentration dans le milieu, des ajouts fréquents (deux fois par jour) et en grande quantité sont nécessaires puisque cet ion est absorbé rapidement. Ces ajouts causent d'importantes variations de la concentration en ammonium dans le milieu de culture. Les concentrations élevées en ammonium pouvant être potentiellement toxiques pour les cellules, le développement d'un système de culture avec alimentation continue des nutriments pour l'obtention de cultures à haute densité pourrait être intéressant puisqu'il permet le maintien de conditions de croissance plus stables.

## 8. RÉFÉRENCES

AUBRY, D. (1995). Développement et commande d'un bioprocédé de production de sanguinarine à partir de la culture en suspension de cellules de plantes, Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals, New-York, 2<sup>e</sup> édition, McGraw-Hill, 1986, 984 p.

BALLICA, R., RYU, D.D.Y. (1993). Effects of Rheological Properties and Mass Transfer on Plant Cell Bioreactor Performance : Production of Tropane Alkaloids, Biotechnology and Bioengineering, **42**, p. 1181-1189.

BLEVINS, D.G., REINBOTT, T.M. (1998). Impact of Phosphorus Nutrition on Magnesium , Calcium, and Water Status of Plants, Phosphorus in Plant Biology : Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes, J.P. Lynch, J. Deikman, eds, p. 168-177.

BRETELIER, H., NISSEN, P. (1982). Effect of Exogenous and Endogenous Nitrate Concentration on Nitrate Utilisation by Dwarf Bean, Plant Physiology, **70**, p. 754-759.

CARROLL, A.D., STEWART, G.R., PHILLIPS, R. (1992). Dynamics of Nitrogenous Assimilate Partitioning Between Cytoplasmic and Vacuolar Fractions in Carrot Cell Suspension Cultures, Plant Physiology, **100**, p. 1808-1814.



CLARKSON, D.T., HANSON, J.B. (1980). The Mineral Nutrition of Higher Plants, Plant Physiology, **31**, p.239-298.

CRAWFORD, N.M. (1995). Nitrate : Nutrient and Signal for Plant Growth, The plant Cell, **7**, p. 859-868.

CRAWFORD, N.M., GLASS, A.D.M. (1998). Molecular and Physiological Aspects of Nitrate Uptake in Plants, Trends in Plant Science, **3**, p. 389-395.

DIXON, R.A. (1985). Isolation and maintenance of Callus and Cell Suspension Cultures, Plant Cell Culture a Practical Approach, Oxford, Washington, IRL Press, p.1

DO, C.B., CORMIER, F. (1991). Effects of High Ammonium Concentrations on Growth and Anthocyanin Formation in Grape (*Vitis vinifera* L.) Cell Suspension cultured in a Production Medium, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **27**, p.169-174.

DUNLOP, E.H., NAMDEV, P.K. (1994). Effect of Fluid Shear Forces on Plant Cell Suspensions", Chemical Engineering Science, **49**, p. 2263-2276.

HO, C.H., HENDERSON, K.A., RORRER, G.L. (1995). Cell Damage and Oxygen Mass Transfer during Cultivation of *Nicotiana tabacum* in Stirred-Tank Bioreactor, Biotechnology Progress, **11**, p. 140-145.

JOLICOEUR, M. CHAVARIE, C., CARREAU, P.J., ARCHAMBAULT, J. (1992). Development of a Helical-Ribbon Impeller Bioreactor for High-Density Plant Cell Suspension Culture, Biotechnology and Bioengineering, **39**, p. 511-521.

KAMEN, A.A., CHAVARIE, C., ANDRÉ, G., ARCHAMBAULT, J. (1992). Design Parameters and Performance of a Surface Baffled Helical Ribbon Impeller Bioreactor for the Culture of Shear Sensitive Cells, Chemical Engineering Science, **47**, p. 2375-2380.

KIERAN, P.M., O'DONNELL, H.J., MALONE, D.M., MACLOUGHLIN, P.F. (1995). Fluid Shear Effects on Suspension Cultures of *Morinda citrifolia*, Biotechnology and Bioengineering, **45**, p.415-425.

KIERAN, P.M. MACLOUGHLIN, P.F., MALONE, D.M. (1997). Plant Cell Suspension Cultures : Some Engineering Considerations, Journal of Biotechnology, **59**, p. 39-52.

LIU, S., ZHONG, J.J. (1997). Simultaneous Production of Ginseng Saponin and Polysaccharide by Suspension cultures of *Panax ginseng* : Nitrogen Effects, Enzyme and Microbial Technology, **21**, p. 518-524.

LOWE, K.C., DAVEY, M.R., POWER, B.J. (1998). Perfluorochemicals : their Applications and Benefits to Cell Culture, Trends in Biotechnology, **16**, p.272-277.

MATSUBARA, K., KITANI, S., YOSHIOKA, T., MORIMOTO, T., YASUHIRO, F. (1989). High Density Culture of *Coptis japonica* Cells Increases Berberine Production, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 46, p. 61-69.

McCABE, W.L., SMITH, J.C., HARRIOTT, P. Unit Operations of Chemical Engineering, New York, 5<sup>e</sup> édition, McGraw-Hill, 1993, 1130 p.

MORI, T., SAKURAI, M. (1994). Production of Anthocynin from Strawberry Cell Suspension Cultures; Effects of Sugar and Nitrogen, Journal of food science, 59, p.588-593.

NIGRA, H.M., ALVAREZ, M.A., GIULIETTI, A.M. (1990). Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Growth and Solasodine Production in Batch Suspension Cultures of *Solanum eleagnifolium* Cav., Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21, p. 55-60.

PANDA, A.K., MISHRA, S., BISARIA, V.S. (1992). Alkaloid Production by Plant Cell Suspension Cultures of *Holarrhena antidysenterica* : I. Effect of Major Nutrients, Biotechnology and Bioengineering, 39, p. 1043-1051.

PÉPIN, M.F. (1996). Étude de l'étape de croissance de cellules de Vitis vinifera cultivées en bioréacteur pour la production d'anthocyanes, Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal, Canada.

PLAXTON, W.C. (1998). Metabolic Aspects of Phosphate Starvation in Plants, Phosphorus in Plant Biology : Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes, J.P. Lynch, J. Deikman, eds, p. 229-241.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. Biology of Plants, New York, 5<sup>e</sup> édition, Worth Publishers, 1992, 791 p.

RIOUX, F. (1996). Modélisation de la phase de croissance de cellules d'Eschscholtzia californica, Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

SAKANO, K., MATSUMOTO, M., YAZAKI, Y., KIYOTA, S., OKIHARA, K. (1995). Inorganic Phosphate as a Negative Conditioning Factor in Plant Cell Culture, Plant Science, 107, p. 117-124.

SALISBURY, B., ROSS, C.W. Plant Physiology, Belmont, California, 4<sup>e</sup> édition, Wadsworth Publishing Company, 1991.

SARGENT, P.A., KING, J. (1974). Investigations of Growth-Promoting Factors in conditioned Soybean Root Cells in the Liquid Medium in which they grow : Ammonium, Glutamine, and Amino Acids, Canadien Journal of Botany, 52, p. 1747-1755.

SCHLATMANN, J.E., VINKE, J.L., TEN HOOPEN, H.J.G., HEIJNEN, J.J. (1995). Relation Between Dissolved Oxygen Concentration and Ajmalicine Production Rate in High-Density Cultures of *Catharanthus roseus*, Biotechnology and Bioengineering, **45**, p. 435-439.

SCRAGG, A.H. (1995). The Problems associated with High Biomass Levels in Plant Cell Suspensions, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **43**, p. 163-170.

SHULER, M.L., KARGI, F. Bioprocess Engineering, Basic Concepts, New Jersey, Prentice Hall PTR, 1992, 479 p.

SIROIS, J. (1997). Optimisation de la croissance de cellules d'Eschscholtzia californica en bioréacteur, Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

STÖCKIGT, J., OBITZ, P., FALKENHAGEN, H., LUTTERBACH, R., ENDREß, S. (1995). Natural Products and Enzymes from Plant Cell Cultures, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **43**, p. 97-109.

SU, W.W., HUMPHREY, A.E. Studies on the Different Oxygenation Methods for enhancing Oxygen Transfer in High Cell Density Plant Tissue Cultures, Presented at the 1989 AIChE Annual Meeting, november 9 1989, San Francisco, 19 p.

TANAKA, H. (1982). Oxygen Transfer in Broths of Plant Cells at High Density, Biotechnology and Bioengineering, **24**, p.425-442.

TANAKA, H. (1981). Technological Problems in Cultivation of Plant Cells at High Density, Biotechnology and Bioengineering, **23**, p. 1203-1218.

TEN HOOPEN, H.J.G., VAN GULIK, W.M., SCHLATMANN, J.E., MORENO, P.R.H., VINKE, J.L., HEIJNEN, J.J., VERPOORTE, R. (1994). Ajmalicine Production by Cell Cultures of *Catharanthus roseus* : from Shake Flasks to Bioreactor, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **38**, p. 85-91.

The Gale Encyclopedia of Science, Vol. 1, Détroit, Gale Research, 1996, p. 129-132.

VANDEMARK, P.J., BATZING, B.L. The Microbes an Introduction to Their Nature and Importance, Menlo Park, The Benjamin/Cummings publishing company, 1987, 991 p.

VERPOORTE, R., VAN DER HEIJDEN, R., SCHRIJPEMA, (1993). J. Plant Cell Biotechnology for the Production of Alkaloids : Present Status and Prospects, Journal of Natural Products, **56**, p. 186-207.

VERPOORTE, R. (1998). Exploration of Nature's Chemodiversity : the Role of Secondary Metabolites as Leads in Drug Development, Drug Discovery Today, **3**, p. 232-238.

WETTER, L. R., CONSTABEL, F. Plant Tissue Culture Methods, Saskatoon, 2<sup>e</sup> édition, National Research Council of Canada, 1982.

WILLIAMS, R.D., ELLIS, B.E. (1993). Alkaloids from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed *Papaver somniferum* Cultures, Phytochemistry, **32**, p. 719-723.

WONGSAMUTH, R., DORAN, P.M. (1994). Foaming and Cell Flotation in Suspended Plant Cell Cultures and the Effect of Chemical Antifoams, Biotechnology and Bioengineering, **44**, p. 481-488.

WU, J., ZHONG, J.J. (1999). Production of Ginseng and Its Bioactive Components in Plant Cell Culture : Current Technological and Applied Aspects, Journal of Biotechnology, **68**, p. 89-99.

YANG, J.D., WANG, N.S. (1992). Cell Inactivation in the Presence of Sparging and Mechanical Agitation, Biotechnology and Bioengineering, **40**, p. 806-816.

YANG, J.D., WANG, N.S. (1992). Oxygen Mass transfer Enhancement via Fermentor Headspace Pressurization, Biotechnology Progress, **8**, p. 244-251.

ZHANG Y.H., ZHONG, J.J. (1997). Hyperproduction of Ginseng Saponin and Polysacharide by High Density Cultivation of *Panax notoginseng* Cells, Enzyme and Microbial Technology, **21**, p. 59-63.

ZHONG, J.-J., YOSHIDA, T. (1995). High-Density Cultivation of *Perilla frutescens* Cell Suspension for Anthocyanin Production : Effects of Sucrose Concentration and Inoculum Size, Enzyme and Microbial Technology, **17**, 1073-1079.

ZHONG, J.J., FUJIYAMA, K., SEKI, T., YOSHIDA, T.A. (1994). Quantitative Analysis of Shear Effects on Cell Suspension and Cell Culture of *Perilla frutescens* in Bioreactors, Biotechnology and Bioengineering, 44, p. 649-664.

ZHONG, J.J., SEKI, T., KINOSHITA, S.I., YOSHIDA, T. (1992). Rheological Characteristics of Cell Suspension and Cell Culture of *Perilla frutescens*, Biotechnology and Bioengineering, 40, p. 1256-1262.



## **ANNEXES**

### **A.1. Solutions pour les comptes cellulaires**

#### **Tampon citrate**

Solution A : 2,9 g de citrate de sodium dans 100 ml d'eau distillée

Solution B : 2,1 g d'acide citrique dans 100 ml d'eau distillée

Ajouter la solution A à la solution B, jusqu'à un pH de 4,5.

#### **Solution enzymatique**

Dissoudre 175 mg de cellulase (6,3 unités enzymatiques par mg, Sigma) et 230 mg d'hémicellulase (0,013 unités enzymatiques par mg, Sigma) dans 100 ml de tampon citrate. Ajouter 1,1 ml de pectinase (445 unités enzymatiques par ml, Sigma).

#### **Solution de carbol fuschine**

Solution A : Dissoudre 3g de fuschine basique dans 100 ml d'éthanol à 70% (conservation infinie).

Solution B : Ajouter 10 ml de la solution A à 90 ml d'une solution de phénol à 5%.

Mélanger 45 ml de la solution B avec 6 ml d'acide acétique glacial et 6 ml de formaldéhyde à 37%.

Conserver cette solution à 4°C dans un récipient en verre foncé.

## A.2. Solutions d'ajout

Pour chaque culture, quatre bouteilles de solution d'ajouts étaient préparées pour le glucose, le nitrate, l'ammonium et le phosphate. Ces solutions d'ajouts étaient préparées avec les concentrations suivantes, sauf pour la culture R2, où la concentration en citrate d'ammonium avait été doublée par erreur (500 mM).

Solution d'ajout de sucre : 400 g/L de glucose

Solution d'ajout de nitrate : 800 mM de  $\text{KNO}_3$

Solution d'ajout d'ammonium : 250 mM de citrate d'ammonium

Solution d'ajout de phosphate : 100 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Pour les cultures R2, R4 et R5, les solutions d'ajouts ont été préparées dans de l'eau déminéralisée. Pour les cultures R6, R7 et R9, les solutions ont été préparées dans une solution contenant les micronutriments et les vitamines du milieu B5 ainsi que des hormones et du  $\text{MgSO}_4$  (voir Tableau A.1). Les concentrations de magnésium et d'hormones ont été calculées pour fournir environ deux fois la concentration du milieu B5 en cours de culture. La culture R6 ayant manqué de magnésium, la concentration de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dans les solutions d'ajout, indiquée au Tableau A.1 ( $834 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), a été doublée pour les cultures R7 et R9.

*Tableau A.1 - Solution de nutriments utilisée pour préparer les solutions d'ajouts pour les cultures R6, R7 et R9*

<b>Macronutriments</b>	<b>mg·L<sup>-1</sup></b>	<b>mM</b>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	834	3,34
<b>Micronutriments</b>		<b>μM</b>
KI	0,75	4,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0	50
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10	60
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2,0	7,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	1,0
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
EDTA-ferrique	43,0	100
<b>Vitamines</b>		-
Myo-inositol	100	-
Acide nicotique	1,0	-
Pyridoxine HCl	1,0	-
Thiamine HCl	10,0	-
<b>Hormones</b>		-
Kinétine	0,33	-
Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique	0,66	-
PH	5,5	-

### A.3. Milieux de culture

#### A.3.1. Composition du milieu B5

Tableau A.2 - Composition du milieu B5

Macronutriments	mg·L <sup>-1</sup>	mM
KNO <sub>3</sub>	2500	25
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150	1,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	250	1,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	1,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	150	1,1
Micronutriments		μM
KI	0,75	4,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0	50
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10	60
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2,0	7,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	1,0
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
EDTA-ferrique	43,0	100
Vitamines		-
Myo-inositol	100	-
Acide nicotique	1,0	-
Pyridoxine HCl	1,0	-
Thiamine HCl	10,0	-
Hormones		-
Kinétine	0,1	-
Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique	0,2	-
Sucrose	30 g/L	-
PH	5,5	-

Référence : Wetter, L.R. & Constabel, F. (1982) *Plant tissue culture methods*, 2<sup>nd</sup> edition, NRCC

### A.3.2. Composition du milieu Murashige-Skoog

Tableau A.3 – Composition du milieu Murashige-Skoog

Macronutriments	mg.L <sup>-1</sup>	mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,6
KNO <sub>3</sub>	1900	18,8
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	3,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,2
Micronutriments		μM
KI	0,83	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	100
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	100
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	8,6	30
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	1,0
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,1
EDTA-ferrique	43,0	100
Vitamines		-
Myo-inositol	100	-
Acide nicotique	0,5	-
Pyridoxine HCl	0,5	-
Thiamine HCl	0,1	-
Hormones		-
Kinétine	0,1	-
Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique	0,2	-
Sucrose	30 g/L	-
PH	5,5	-

Référence : Wetter, L.R. & Constabel, F. (1982) *Plant tissue culture methods*, 2<sup>nd</sup> edition, NRCC

## A.4. Principaux résultats des cultures témoins en flacons

### A.4.1. Principaux résultats pour les flacons témoins sans ajout

Tableau A.4 – Principaux résultats pour les flacons témoins sans ajout

	Concentration à l'inoculation			Concentration maximale			Taux de croissance global		Durée (h)
	Biomasse Sèche (g M.S.·L <sup>-1</sup> )	Biomasse humide (g M.H.·L <sup>-1</sup> )	Cellulaire (10 <sup>9</sup> cellules·L <sup>-1</sup> )	Biomasse Sèche (g M.S.·L <sup>-1</sup> )	Biomasse humide (g M.H.·L <sup>-1</sup> )	Cellulaire (10 <sup>9</sup> cellules·L <sup>-1</sup> )	Biomasse (j <sup>-1</sup> )	Cellulaire (j <sup>-1</sup> )	
F5-3	3,7	121	2,3	9,2	274	2,8	0,09	0,02	234
F5-4	3,5	110	1,6	12,4	410	4,8	0,13	0,11	234
F6-3	2,8	116	1,0	13,4	482	5,9	0,14	0,16	263
F6-4	2,8	118	1,0	15,3	490	5,3	0,15	0,15	263
F7-3	2,8	128	1,4	11,3	353	5,3	0,16	0,33	211
F7-4	2,8	130	1,4	10,9	356	5,3	0,15	0,35	211
F9-2	1,3	94	0,6	8,9	315	5,8	0,22	0,26	331

#### A.4.2. Principaux résultats pour les flacons avec ajouts

Tableau A.5 – Principaux résultats pour les flacons avec ajouts

	Concentration à l'inoculation			Concentration maximale			Taux de croissance global		Durée (h)
	Biomasse Sèche (g M.S.·L <sup>-1</sup> )	Biomasse humide (g M.H.·L <sup>-1</sup> )	Cellulaire (10 <sup>9</sup> cellules·L <sup>-1</sup> )	Biomasse Sèche (g M.S.·L <sup>-1</sup> )	Biomasse humide (g M.H.·L <sup>-1</sup> )	Cellulaire (10 <sup>9</sup> cellules·L <sup>-1</sup> )	Biomasse (j <sup>-1</sup> )	Cellulaire (j <sup>-1</sup> )	
F2-1	0,8	59	0,5	17,0	349	6,5	0,18	0,23	406
F2-2	1,0	61	0,8	15,3	322	6,4	0,16	0,15	406
F4-1	3,1	138	1,2	16,3	450	8,8	0,14	0,20	286
F4-2	3,0	144	1,3	12,7	373	9,7	0,12	0,17	286
F5-1	2,7	94	1,5	10,0	220	4,9	0,13	0,10	309
F5-2	3,0	110	1,7	9,2	245	6,0	0,10	0,13	309
F6-1	1,9	127	1,0	11,6	266	7,8	0,13	0,19	356
F6-2	2,7	127	0,8	13,5	283	7,4	0,11	0,20	356
F7-1	2,4	127	1,7	11,9	315	9,0	0,12	0,15	355
F7-2	2,6	126	1,7	12,0	308	9,5	0,13	0,17	355
F9-1	1,3	107	1,1	4,7	160	5,5	0,19	0,12	404